

**Charakterisierung von Proben diabetischer  
*INS<sup>C94Y</sup>* transgener Schweine aus dem *Munich*  
*MIDY-Pig Biobank* Projekt**

von

Serena Haesner, geb. Resele

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Charakterisierung von Proben diabetischer *INS*<sup>C94Y</sup>  
transgener Schweine aus dem *Munich MIDY-Pig*  
*Biobank* Projekt**

von Serena Haesner, geb. Resele  
aus Friedberg

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. Andreas Parzefall (geb. Blutke)

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Nicolai Siegel

**Tag der Promotion: 10.02.2018**



*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Literaturübersicht .....	3
2.1 Definition des Diabetes mellitus.....	3
2.2 Klassifikation des Diabetes mellitus.....	3
2.2.1 Diabetes mellitus Typ 1.....	5
2.2.2 Diabetes mellitus Typ 2.....	6
2.2.3 Andere spezifische Diabetesformen .....	7
2.2.4 Gestationsdiabetes .....	8
2.3 Epidemiologie des Diabetes mellitus .....	9
2.4 Diabetische Folgeerkrankungen .....	10
2.4.1 Makroangiopathien .....	11
2.4.2 Mikroangiopathien.....	13
2.4.2.1 Diabetische Nephropathie.....	16
2.4.2.2 Diabetische Neuropathie.....	22
2.4.2.3 Diabetische Retinopathie .....	25
2.5 Diagnostik diabetischer Folgeerkrankungen.....	26
2.5.1 Diabetische Makroangiopathie.....	26
2.5.2 Diabetische Nephropathie.....	27
2.5.3 Diabetische Neuropathie.....	29
2.5.4 Quantitativ-morphologische Analyseverfahren bei der Diagnostik frühstadialer diabetischer Veränderungen.....	31
2.6 Tiermodelle in der Diabetes mellitus-Forschung.....	33
2.6.1 Nagermodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus .....	34

2.6.1.1	Nagermodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus Typ 1.....	34
2.6.1.2	Nagermodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus Typ 2.....	37
2.6.2	Nagermodelle für die Erforschung diabetischer Folgeerkrankungen ....	42
2.6.3	Großtiermodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus .....	51
2.6.3.1	Schweinemodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus.....	53
3.	Material und Methoden .....	61
3.1	Das <i>Munich MIDY-Pig Biobank</i> Projekt (Blutke et al. 2017) .....	61
3.1.1	Versuchstiere .....	63
3.1.2	Sektion und Probennahme .....	63
3.2	Ziel der Arbeit .....	68
3.3	Morphologische Untersuchung des Pankreas .....	68
3.3.1	Probennahme und Paraffineinbettung .....	68
3.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Pankreasschnitte .....	70
3.3.3	Immunhistochemische Darstellung der $\beta$ -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas .....	71
3.3.4	Quantitativ-stereologische Analysen an Pankreasproben .....	72
3.4	Morphologische Untersuchung der Nieren .....	74
3.4.1	Gewinnung der Nierenproben.....	74
3.4.2	Ermittlung des Nierenvolumens ( $V_{(Niere)}$ ) .....	76
3.4.3	Bestimmung der Volumendichte ( $V_{V(Kortex/Niere)}$ ) und des gesamten Volumens ( $V_{(Kortex, Niere)}$ ) des Nierenkortex in den perfusionsfixierten Nieren .....	76
3.4.4	Kunststoffeinbettung der Nierengewebeproben .....	78
3.4.5	Färbungen der Kunststoffschnitte .....	79
3.4.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	79
3.4.5.2	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS).....	80

3.4.5.3 Versilberung nach Rambourg kombiniert mit der PAS-Reaktion.....	81
3.4.6 Bestimmung der Volumendichte ( $V_{V(\text{Glom/Kortex})}$ ) und des gesamten Volumens ( $V_{(\text{Glom, Kortex})}$ ) der Glomerula im Nierenkortex.....	82
3.4.7 Bestimmung des mittleren Glomerulumvolumens ( $V_{(\text{Glom})}$ ) nach Weibel und Gomez.....	84
3.4.8 Ermittlung der linearen Schrumpfungskorrekturfaktoren für in GMA/MMA bzw. in Epon eingebettete Schweinenierengewebebeben ..... 86	86
3.4.9 Bestimmung der Volumendichte ( $V_{V(\text{Mes/Glom})}$ ) und des gesamten Volumens ( $V_{(\text{Mes, Glom})}$ ) des Mesangiums im Glomerulum.....	87
3.4.10 Eponeinbettung der Nierenproben und Anfertigung von Semidünnschnitten.....	89
3.4.11 Toluidinblau-Safranin-Färbung der Semidünnschnitte.....	91
3.4.12 Schätzung der numerischen Dichte ( $N_{V(\text{Zellen/Glom})}$ ) und der Anzahl der glomerulären Zellen ( $N_{(\text{Zellen, Glom})}$ ) im Glomerulum mit dem physikalischen Disektor-Prinzip.....	92
3.4.13 Bestimmung des minimalen mittleren Durchmessers von porzinen Podozytenkernanschnittsprofilen.....	97
3.4.14 Bestimmung der Volumendichte der Podozyten ( $V_{V(\text{Pod/Glom})}$ ) und des Gesamtpodozytenvolumens ( $V_{(\text{Pod, Glom})}$ ) im Glomerulum sowie des mittleren Podozytenvolumens ( $V_{(\text{Pod})}$ ).....	98
3.4.15 Anfertigung und Kontrastierung von Ultradünnschnitten für die Auswertung am Transmissionselektronenmikroskop (TEM).....	100
3.4.16 Bestimmung der Filtrationsschlitzfrequenz (FSF).....	101
3.4.17 Ermittlung der wahren harmonischen mittleren Dicke der glomerulären Basalmembran ( $T_{h(\text{GBM})}$ ).....	103
3.5 Analyse der Urinproben.....	106

3.5.1	Harndichtemessung .....	106
3.5.2	Urinproteinanalyse durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	106
3.5.2.1	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....	110
3.5.2.2	Trocknung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	111
3.6	Morphologische Untersuchung des Nervus fibularis communis .....	112
3.6.1	Probengewinnung .....	112
3.6.2	Anfertigung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Paraffinschnitte des Nervus fibularis communis .....	113
3.6.3	Herstellung von Teasingpräparaten des Nervus fibularis communis ..	113
3.6.4	Quantitativ-stereologische Analysen an Proben des Nervus fibularis communis .....	115
3.6.4.1	Bestimmung der Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern ( $V_{V(\text{Myelin/NF})}$ ) .....	116
3.6.4.2	Berechnung der g-Ratio nach Rushton.....	117
3.7	Morphologische Untersuchung ausgewählter Blutgefäße .....	118
3.7.1	Probengewinnung .....	118
3.7.2	Anfertigung und Färbung der Paraffinschnitte.....	119
3.7.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Gefäßschnitte .....	119
3.7.2.2	Pikrosirius-Rot-Färbung der Gefäßschnitte zur Darstellung von Kollagenfasern .....	119
3.7.2.3	Elastika-van-Gieson-Färbung (WEG) der Gefäßschnitte zur Darstellung von elastischen Fasern in Gefäßwänden .....	120
3.7.2.4	Von-Kossa-Färbung der Gefäßschnitte zur Darstellung von Kalziumablagerungen.....	122

3.7.2.5 Masson-Trichrom-Färbung der Gefäßschnitte zur Darstellung von Bindegewebsstrukturen .....	123
3.7.2.6 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) der Gefäßschnitte zur Darstellung von kohlenhydrathaltigen Strukturen .....	126
3.8 Statistik.....	128
4. Ergebnisse.....	129
4.1 Körpergewicht.....	129
4.2 Ergebnisse der Untersuchung des Pankreas .....	129
4.2.1 Absolutes Pankreasgewicht, relatives Pankreasgewicht und Pankreasvolumen.....	129
4.2.2 Qualitativ-histologische Befunde der Pankreasuntersuchung .....	130
4.2.3 Ergebnisse der quantitativ-stereologischen Schätzung der Volumendichte der $\beta$ -Zellen im Pankreas ( $V_{V(\beta\text{-Zellen/Pan})}$ ) und der $\beta$ -Zellmasse ( $V_{(\beta\text{-Zellen, Pan})}$ ).....	133
4.3 Ergebnisse der Untersuchung der Nieren .....	134
4.3.1 Absolutes Nierengewicht, relatives Nierengewicht und Nierenvolumen.... .....	134
4.3.2 Qualitativ-histologische Untersuchungsbefunde der perfusionsfixierten Nieren .....	136
4.3.3 Ergebnisse der quantitativ-stereologischen Analysen der perfusionsfixierten Nieren.....	139
4.3.3.1 Volumendichte ( $V_{V(\text{Kortex/Niere})}$ ) und Gesamtvolumen ( $V_{(\text{Kortex, Niere})}$ ) des Nierenkortex in der Niere.....	139
4.3.3.2 Volumendichte ( $V_{V(\text{Glom/Kortex})}$ ) und Gesamtvolumen ( $V_{(\text{Glom, Kortex})}$ ) der Glomerula im Nierenkortex.....	140

4.3.3.3 Mittleres Glomerulumvolumen ( $V_{(Glom)}$ ) .....	141
4.3.3.4 Volumendichte ( $V_{V(Mes/Glom)}$ , $V_{V(Pod/Glom)}$ ), Gesamtvolumen ( $V_{(Mes, Glom)}$ , $V_{(Pod, Glom)}$ ) des Mesangiums bzw. der Podozyten im Glomerulum und mittleres Podozytenvolumen ( $V_{(Pod)}$ ) .....	142
4.3.3.5 Numerische Dichte glomerulärer Zellen im Glomerulum ( $N_{V(Zellen/Glom)}$ )	145
4.3.3.6 Anzahl der Zellen pro Glomerulum ( $N_{(Zellen, Glom)}$ ) .....	145
4.3.3.7 Filtrationsschlitzfrequenz (FSF) .....	146
4.3.3.8 Dicke der glomerulären Basalmembran ( $T_{h(GBM)}$ ) .....	146
4.4 Ergebnisse der Urinuntersuchung .....	148
4.4.1 Harndichte.....	148
4.4.2 SDS-PAGE Urinproteinanalyse.....	148
4.5 Ergebnisse der Untersuchung des Nervus fibularis communis .....	149
4.5.1 Qualitativ-histologische Untersuchungsbefunde des Nervus fibularis communis .....	149
4.5.2 Ergebnisse der quantitativ-stereologischen Analysen des Nervus fibularis communis.....	152
4.5.2.1 Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern ( $V_{V(Myelin/NF)}$ )	152
4.5.2.2 g-Ratio nach Rushton .....	154
4.6 Ergebnisse der Untersuchung ausgewählter Blutgefäße.....	155
4.6.1 Qualitativ-histologische Untersuchungsbefunde ausgewählter Blutgefäße .....	155
5. Diskussion .....	159
5.1 Grundlagen und Ziele der Studie.....	159
5.2 Morphologische Untersuchung des Pankreas zweijähriger <i>INS<sup>C94Y</sup></i> transgener Schweine .....	162

5.3	Morphologische Untersuchung der Nieren zweijähriger <i>INS</i> <sup>C94Y</sup> transgener Schweine im Hinblick auf das Auftreten Dm-assoziierter Alterationen.....	164
5.4	Morphologische Untersuchung des Nervus fibularis communis zweijähriger <i>INS</i> <sup>C94Y</sup> transgener Schweine im Hinblick auf das Auftreten Dm-assoziierter Alterationen.....	174
5.5	Morphologische Untersuchung von Blutgefäßen zweijähriger <i>INS</i> <sup>C94Y</sup> transgenen Schweine im Hinblick auf das Auftreten Dm-assoziierter Alterationen ... .....	177
5.6	Ausblick .....	178
6.	Zusammenfassung.....	180
7.	Summary.....	182
8.	Literaturverzeichnis .....	184
9.	Anhang.....	198
9.1	Neuropathie-Symptom-Score (NSS) .....	198
9.2	Neuropathie-Defizit-Score (NDS) .....	198
9.3	Dimensionen der logarithmischen Messskala für die Messung der GBM-Dicke ( $T_{h(Glom)}$ ).....	199
9.4	Rechenbeispiel für die Berechnung der Dicke ( $T_{h(Glom)}$ ) der GBM .....	200
9.5	Numerische Dichte der glomerulären Zellen im Glomerulum bei den Wildtypkontrolltieren und den <i>INS</i> <sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen.....	201
10.	Wissenschaftliche Publikationen in „Refereed Journals“ und Beiträge auf wissenschaftlichen Kongressen.....	202
11.	Danksagung .....	204



## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (angiotensin converting enzyme)
ADA	Amerikanische Diabetes Gesellschaft (American Diabetes Association)
AGE	Glykierungsendprodukt (advanced glycation end product)
AOK	Allgemeine Ortskrankenkassen
ApoE	Apolipoprotein E
ApoB	Apolipoprotein B
AVK	arterielle Verschlusskrankheit
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Ay	Agouti-gelb (agouti yellow)
BB	biobreeding
BBZDR	biobreeding Zucker diabetes-resistant
BR	Bradykinin Rezeptor
BTBR	schwarz und braun, brachyurisch (black and tan, brachyuric)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary deoxyribonucleic acid)
CRP	C-reaktives Protein
Cyp1a1	Cytochrome P450 1a1
DAG	Diacylglycerol
db	diabetisch (diabetic)
DBA	schwach braun, nicht-Agouti (dilute brown, non-agouti)

DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DiaComb	Konsortium für diabetische Komplikationen (Diabetic Complications Consortium)
DIO	Fütterungs-induzierte Fettsucht (diet-induced obesity)
Dm	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DSPN	distal-symmetrische sensomotorische Neuropathie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (endothelial nitric oxide synthase)
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FS	Filtrationsschlitz
FSF	Filtrationsschlitzfrequenz
FVB	Friend-Virus B
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GH	Wachstumshormon (growth hormone)
GIP	Glukose-abhängiges insulinotropes Polypeptid (glucose-dependent insulinotropic polypeptid)
GIPR <sup>dn</sup>	dominant-negativer Rezeptor für das Glukose-abhängige insulinotrope Polypeptid (dominant

	negative glucose-dependent insulintropic polypeptid receptor)
GK	Goto-Kakizaki
GLP-1	Glukagon-ähnliches Peptid 1 (glukagon-like peptide-1)
GMA	2-Hydroxyethylmetacrylat
HCL	Hydrogenchlorid
HE	Hämatoxylin-Eosin
hIAPP	humanes Inselamyloid Polypeptid
HNF1 $\alpha$	Hepatozyten-Nuklearfaktor 1 Alpha (hepatocyte nuclear factor 1 alpha)
IAA	Autoantikörper gegen Insulin (insulin autoantibodies)
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule)
ICA	Antikörper gegen Inselzellen (islet-cell antibodies)
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor)
IHC	Immunhistochemie
INS	Insulingen
IUR	isotrop, mit gleichförmiger Zufälligkeit (isotropic uniform random)
KGW	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
KK	Kuo Kondo
LCM	Lymphozytäre-Choriomeningitis
LCMV-GP	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus Glykoprotein
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (low density lipoprotein)

LDLR	Rezeptor für Lipoproteine geringer Dichte (low density lipoprotein-receptor)
<i>Lep</i>	Leptingen
<i>Lepr</i>	Leptinrezeptorgen
LETL	Long-Evans Tokushima lean
LETO	Long-Evans Tokushima Otsuka
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex)
MIDY	durch eine Mutation des Insulingens hervorgerufener Diabetes mellitus, der bereits in jungen Jahren auftritt (mutant insulin gene-induced diabetes of youth)
MMA	Methylmetacrylat
MODY	„Altersdiabetes“, der bereits in jungen Jahren auftritt (maturity-onset diabetes of youth)
mRen	murines Renin (murine renin)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDS	Neuropathie-Defizit-Score
NF-κB	Nuklearfaktor Kappa B (nuclear factor kappa B)
NI	Niereninsuffizienz
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
NOD	nicht-adipös diabetisch (non-obese diabetic)
NON	nicht-adipös nicht-diabetisch (non-obese non-diabetic)
NOX	NAD(P)H-Oxidase
NSS	Neuropathie-Symptom-Score

NSY	Nagoya Shibata Yasuda
NZO	Neuseeland adipös (New Zealand obese)
ob	adipös (obese)
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima fatty
OVE	überexprimierend (overexpressing)
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (Periodic-acid-Schiff-Reaktion)
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PNDM	permanenter neonataler Diabetes mellitus
POD	Peroxidase
RAGE	Rezeptor für Glykierungsendprodukte (receptor for advanced glycation endproducts)
RIP	Ratten-Insulin-Promotor
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

STZ	Streptozotozin
TBS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) gepufferte Kochsalzlösung (tris-buffered saline)
TEMED	Tetraethylethylendiamin
TG	transgen
TGF- $\alpha$	transformierender Wachstumsfaktor Alpha (transforming growth factor $\alpha$ )
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor Beta (transforming growth factor $\beta$ )
TGF- $\beta$ 1	transformierender Wachstumsfaktor Beta 1 (transforming growth factor $\beta$ 1)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (vascular cell adhesion molecule)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
WBN/Kob	Wistar Bonn/Kobori
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
WT	Wildtyp
ZDF	Zucker diabetic fatty

## 1. Einleitung

Diabetes Mellitus (Dm) stellt aufgrund seiner stetig steigenden Prävalenz und Inzidenz ein globales gesundheitliches Problem dar. Im Jahr 2015 waren 415 Millionen Menschen weltweit von der Zuckerkrankheit betroffen, darunter allein 6,5 Millionen Menschen in Deutschland (Cho et al. 2015). Aufgrund der zahlreichen Komplikationen, die die Erkrankung mit sich bringt, können hierzulande jährlich bis zu 40000 Amputationen und 2000 Neuerblindungen registriert werden, die Folge einer diabetischen Neuropathie bzw. Retinopathie sind. 2300 weitere Dm-Patienten werden aufgrund der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie zu einem Leben mit Dialyse gezwungen (Rathmann et al. 2015).

Diese Daten verdeutlichen die enorme Bedeutung einer intensiven Diabetesforschung mit dem Ziel, die Pathogenese des Dm und seiner Folgeerkrankungen weiter zu ergründen und neue Therapieansätze zu etablieren. Bisherige Forschungsergebnisse basieren zum großen Teil auf Erkenntnissen aus diversen Nagetiermodellen des Dm (Cefalu 2006, Chatzigeorgiou et al. 2009) bzw. auf der Auswertung von Blut- und Gewebeproben von Dm-Patienten. Beide Ansätze weisen Limitationen auf. So gibt es derzeit kein Mausmodell, das das volle Spektrum Dm-assoziierter Folgeerkrankungen entwickelt (Cefalu 2006, Yeadon 2015). Die Auswertung humaner Proben wird durch die Heterogenität der Patientenkollektive und den generierbaren Mengen von biologischen Probenmaterialien eingeschränkt. Neben Alters-, Ethnien- und Geschlechtsunterschieden und der Krankheitsdauer erschwert das Auftreten einer Vielzahl verschiedener Folge- und Begleiterkrankungen sowie unterschiedlichste Therapieansätze die Erforschung des Dm. Außerdem erfolgt die Entnahme der Proben meist erst in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien, was die Diagnostik frühstadialer Alterationen signifikant kompliziert.

Aufgrund dieser Limitationen und dank der physiologischen Nähe zum Menschen stehen in jüngster Zeit diabetische Schweinemodelle verstärkt im Fokus des wissenschaftlichen Interesses (Bellinger et al. 2006, Aigner et al. 2010, Wolf et al. 2014). Ein solches Schweinmodell sind genetisch modifizierte *INS<sup>C94Y</sup>* transgene Schweine, die als Folge einer Mutation im Insulingen einen permanenten neonatalen Dm entwickeln. Das frühe Auftreten des Dm bei diesen Tieren führt bereits im Alter von einem Jahr zu erhöhten Blutglukosespiegeln, diabetischen Linsentrübungen (Katarakten) und einem progressiven Verlust der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas (Renner et al. 2013). Um das Auftreten diabetischer Folgeerkrankungen bei langzeitdiabetischen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen zu untersuchen, wurde eine Kohorte zwei Jahre alter *INS<sup>C94Y</sup>* transgener Schweine und entsprechender Kontrolltiere erstellt und im Rahmen der vorliegenden Studie mit quantitativen, qualitativ-morphologischen und funktionellen Analyseverfahren untersucht.

Für die Asservierung des wertvollen Probenmaterials der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine wurde eine Biobank umfangreicher Gewebe- und Körperflüssigkeitenproben der Tiere angelegt, die „*Munich MIDY-Pig Biobank*“ (Abbott 2015).

Ziel der vorliegenden Studie war die Klärung der Frage, ob langzeitdiabetische *INS<sup>C94Y</sup>* transgene Schweine aus der *Munich MIDY-Pig Biobank* Dm-assoziierte Alterationen entwickeln. Hierbei umfasste der Schwerpunkt des Untersuchungsspektrums Organe, bei denen Dm-assoziierte Veränderungen beim Menschen auftreten (Pankreas, Niere, Nerven, Gefäße).



## **2. Literaturübersicht**

### **2.1 Definition des Diabetes mellitus**

Der Begriff „Diabetes mellitus“, auch bekannt als „Zuckerruhr“, stammt von dem griechischen Wort „diabainein“ ab, was „die Beine spreizen“ bedeutet. Dies ist eine Anspielung auf die vermehrte Harnausscheidung bei den Erkrankten. Außerdem beinhaltet der Begriff das lateinische Wort „mellitus“, was „honigsüß“ bedeutet. Bereits die Wortherkunft weist auf den für Diabetes mellitus (Dm) charakteristischen Symptomkomplex Polyurie und Polydipsie sowie auf den erhöhten Glukosegehalt im Urin hin (Dudenredaktion 2014).

Nach Angaben der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) umfasst der Begriff Diabetes mellitus eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, die sich durch das Auftreten einer chronischen Hyperglykämie auszeichnen. Als Ursache gelten eine gestörte Insulinsekretion bzw. eine gestörte Insulinwirkung, die auch in Kombination auftreten können (Kerner und Brückel 2015).

### **2.2 Klassifikation des Diabetes mellitus**

Die ersten Empfehlungen zur Klassifikation des Diabetes mellitus wurden 1965 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) herausgegeben. Begriffe wie Insulin-abhängiger und Insulin-unabhängiger Dm, Altersdiabetes und jugendlicher Diabetes wurden in diesem Zusammenhang etabliert. Da diese Einteilung des Dm jedoch einzig auf die verschiedenen Therapieformen, nicht jedoch auf die pathogenetischen Hintergründe eingeht, schlug die Amerikanische Diabetes Gesellschaft (ADA) 1997 eine neue Einteilung des Dm vor. Im Jahre 2000 bestätigten die DDG und die WHO diese neue Klassifikation. Seither erfolgt die Einteilung des Dm in Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes, andere spezifische Diabetestypen und den Gestationsdiabetes.

Die genaue Einteilung des Dm ist in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: Einteilung des Diabetes mellitus**

<b>1. Typ 1 Diabetes</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunmediert</li> <li>• Idiopathisch</li> </ul>	
<b>2. Typ 2 Diabetes</b>	
<b>3. Andere spezifische Diabetesformen</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genetische Defekte der <math>\beta</math>-Zellfunktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Chromosom 12, Hepatozyten Nuklearfaktor-1<math>\alpha</math> (früher MODY 3)</li> <li>➤ Chromosom 7, Glukokinase (früher MODY 2)</li> <li>➤ Chromosom 20, Hepatozyten Nuklearfaktor-4<math>\alpha</math> (früher MODY 1)</li> <li>➤ Chromosom 13, Insulin Promoterfaktor-1 (früher MODY 4)</li> <li>➤ Chromosom 17, Hepatozyten Nuklearfaktor-1<math>\beta</math> (früher MODY 5)</li> <li>➤ Chromosom 2, Transkriptionsfaktor NeuroD1 (früher MODY 6)</li> <li>➤ Mitochondriale DNA</li> <li>➤ Andere Formen</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genetische Defekte der Insulinwirkung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Typ-A-Insulinresistenz</li> <li>➤ Leprechaunismus</li> <li>➤ Rabson-Mendenhall-Syndrom</li> <li>➤ Lipatrophischer Diabetes</li> <li>➤ Andere Formen</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungen des exokrinen Pankreas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pankreatitis</li> <li>➤ Trauma/Pankreatektomie</li> <li>➤ Pankreasneoplasma</li> <li>➤ Zystische Fibrose</li> <li>➤ Hämochromatose</li> <li>➤ Fibrokalzifizierende Pankreaserkrankungen</li> <li>➤ Andere Pankreaserkrankungen</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endokrinopathien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Akromegalie</li> <li>➤ Cushing Syndrom</li> <li>➤ Glukagonom</li> <li>➤ Phäochromozytom</li> <li>➤ Hyperthyreose</li> <li>➤ Somatostatinom</li> <li>➤ Aldosteronom</li> <li>➤ Andere Endokrinopathien</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medikamenten- und Toxin- induzierter Diabetes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Vacor (Rattengift)</li> <li>➤ Pentamidin</li> <li>➤ Nikotinsäure</li> <li>➤ Glukokortikoide</li> <li>➤ Schilddrüsenhormone</li> </ul>

- Diazoxid
  - B-adrenerge Agonisten
  - Thiazide
  - Phenytoin (Dilantin)
  - $\alpha$ -Interferon
  - Andere Substanzen
  
  - Infektionen
    - Rötelnembryopathie
    - Zytomegalievirus-Infektion
    - Andere Infektionen
  
  - Ungewöhnliche immunmedierte Diabetesformen
    - „Stiff-man-Syndrom“
    - Anti-Insulinrezeptor-Antikörper
    - Andere
  
  - Andere genetische Erkrankungen und Syndrome mit Assoziationen zum Diabetes
    - Down-Syndrom (Trisomie 21)
    - Klinefelter-Syndrom
    - Turner-Syndrom
    - Wolfram-Syndrom
    - Friedrich-Ataxie
    - Chorea-Huntington
    - Laurence-Moon-Biedl-Bardet-Syndrom
    - Myotone Dystrophie
    - Porphyrien
    - Prader-Labhart-Willi-Fanconi-Syndrom
    - Andere
- 

#### 4. Gestationsdiabetes

---

Tabelle abgewandelt nach Kerner et al. (2001).

##### 2.2.1 Diabetes mellitus Typ 1

Der Typ 1 Diabetes mellitus, auch bezeichnet als immunmediierter Diabetes mellitus, zeichnet sich durch eine fortschreitende Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas aus. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um ein autoimmunes Geschehen, bei dem sich verschiedene Autoantikörper im Blut nachweisen lassen. Unter diese fallen Autoantikörper gegen die körpereigenen Inselzellen (ICA), gegen Insulin (IAA), gegen die Tyrosinphosphatasen IA-2 und IA-2 $\beta$  - spezifische Antigene der Inselzellen - und gegen die Glutamat-Decarboxylase (GAD). Die GAD ist ein Enzym, das im Gehirn und in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert wird und die Reaktion von Glutamat zu Gamma-Aminobuttersäure (GABA)

und Kohlenstoffdioxid katalysiert. Bei 85-90% der unter Typ 1 Diabetes mellitus leidenden Patienten kann mindestens einer, meist eher mehrere der oben aufgeführten Antikörper nachgewiesen werden (American Diabetes Association 2008).

Kann kein Autoantikörper ermittelt werden und auch sonst keine ätiologische Diagnose gestellt werden, handelt es sich um den sogenannten idiopathischen Typ 1 Diabetes mellitus.

Allen Formen des Dm Typ 1 ist eine Hyperglykämie gemeinsam, die durch einen absoluten Insulinmangel verursacht wird. Häufig ist die erste Symptomatik eine akut auftretende Ketoazidose, aber auch die klassischen Symptome wie Polyurie und Polydipsie treten auf. Meist wird die Krankheit im Kindesalter diagnostiziert, kann jedoch in jedem Alter vorkommen (Kerner et al. 2001).

### **2.2.2 Diabetes mellitus Typ 2**

Der Typ 2 Diabetes mellitus ist die am häufigsten auftretende Form des Diabetes mellitus. 90-95% der Diabetespatienten leiden darunter (American Diabetes Association 2008). Im Gegensatz zum Typ 1 Dm werden die  $\beta$ -Zellen des Pankreas hier nicht von Autoantikörpern zerstört. Vielmehr ist der Typ 2 Diabetes mellitus durch das Auftreten einer Insulinresistenz gekennzeichnet, die in einem relativen Insulinmangel mündet. Als Ursache für die Insulinresistenz stehen genetische Faktoren sowie vermehrtes Fettgewebe, das aufgrund entzündlicher Vorgänge ein verändertes Adipozytokinsekretionsmuster aufweist, in der Diskussion (Stumvoll und Tönjes 2011). Somit sind Faktoren wie Übergewicht, Bewegungsmangel und höheres Alter prädisponierend für das Auftreten einer Insulinresistenz (Rathmann et al. 2015). Treten Hyperglykämie, abdominelle Adipositas, Dyslipoproteinämie und arterielle Hypertonie gemeinsam auf, spricht man auch vom metabolischen Syndrom. Oftmals

wird die Erkrankung erst spät diagnostiziert, wenn sich bereits Folgeerkrankungen wie diabetische Mikro- und Makroangiopathien manifestiert haben. In vielen Fällen kann beim Typ 2 Dm auf eine insulinsubstituierende Therapie verzichtet werden, da sich die Stoffwechsellage oftmals durch vermehrte Bewegung und spezielle Diäten verbessern lässt (Kerner et al. 2001).

### **2.2.3 Andere spezifische Diabetesformen**

Die weiteren Formen des Diabetes mellitus werden verschiedenen Gruppen zugeteilt. Die erste Gruppe umfasst monogenetische Defekte, die die Funktion der  $\beta$ -Zellen beeinträchtigen. Dabei wird eine verminderte Insulinproduktion beobachtet, die Insulinwirkung ist jedoch nicht beeinflusst.

Da diese Erkrankungen meist vor dem Erreichen des 25. Lebensjahres auftreten (American Diabetes Association 2008), wurden sie früher auch unter dem Begriff „maturity-onset diabetes of youth“ (MODY) zusammengefasst (Kerner et al. 2001).

Die häufigste Form wird durch Mutationen auf Chromosom 12 verursacht und betrifft das Gen des Hepatozyten Nuklearfaktors-1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ). Eine zweite Form betrifft die Glukokinase der  $\beta$ -Zelle, codiert auf Chromosom 7 (Wolf et al. 2014). Seltener treten Mutationen in Genen für weitere Transkriptionsfaktoren auf (Hepatozyten Nuklearfaktor-4 $\alpha$ , Insulin Promoterfaktor-1, Hepatozyten Nuklearfaktor-1 $\beta$ , Transkriptionsfaktor NeuroD1). Auch Punktmutationen mitochondrialer DNA wurden mit Diabetes mellitus in Verbindung gebracht und der „MODY“-Gruppe zugeordnet (American Diabetes Association 2008).

Eine weitere Form dieser Gruppe ist der permanente neonatale Diabetes mellitus (PNDM), verursacht durch Mutationen in einem Gen, das die Untereinheit eines Kaliumkanals der  $\beta$ -Zelle codiert (KCNJ 11), sowie durch Mutationen im Insulingen

selbst, auch bezeichnet als MIDY (mutant insulin gene-induced diabetes of youth) (Wolf et al. 2014).

Der zweiten Gruppe werden Erkrankungen mit Störungen der Insulinwirkung zugeteilt. Bei der Typ-A-Insulinresistenz, dem Leprechaunismus und dem Rabson-Mendenhall-Syndrom führen Mutationen des Insulinrezeptors zum Dm, wohingegen beim Lipatrophischen Diabetes mellitus die dem Insulinrezeptor nachgeschaltete Signaltransduktion betroffen ist (American Diabetes Association 2008).

Neben genetischen Defekten können auch Schäden am exokrinen Pankreas, die zur Reduktion des Bauchspeicheldrüsengewebes führen, und Schädigungen des Pankreas durch toxische Substanzen oder Viren einen Dm auslösen.

Eine weitere Gruppe stellen Endokrinopathien dar, die aufgrund veränderter Hormonspiegel die Insulinwirkung antagonisieren können und folglich zu Dm führen.

Zuletzt seien noch die ungewöhnlichen immunmedierten Diabetes mellitus-Formen erwähnt. Beim Stiff-Man-Syndrom, das das zentrale Nervensystem betrifft, kommen hohe Titer von GAD-Antikörpern vor, die bei jedem dritten Patienten zu Dm führen (American Diabetes Association 2008). Die Anti-Insulinrezeptor-Antikörper hingegen kommen vermehrt bei systemischem Lupus Erythematoses und anderen Autoimmunerkrankungen vor und können durch eine Blockade der Insulinrezeptoren zu Dm führen.

Neben den oben aufgeführten Gruppen sind noch viele weitere Erkrankungen mit Diabetes mellitus assoziiert, aufgelistet in Tabelle 1.

#### **2.2.4 Gestationsdiabetes**

Unter dem Gestationsdiabetes werden sämtliche Dm-Formen zusammengefasst, die erstmalig während einer Schwangerschaft auftreten. Dabei wird weder eine

Unterscheidung anhand des Schweregrades vorgenommen, noch anhand der Dauer des Auftretens.

In den USA entwickeln ca. 4% der Schwangeren einen Gestationsdiabetes, der sich meist im letzten Drittel der Schwangerschaft manifestiert (American Diabetes Association 2008).

### **2.3 Epidemiologie des Diabetes mellitus**

Nach Angaben der *International Diabetes Federation* litten im Jahr 2015 ca. 8,8% (inklusive der geschätzten Dunkelziffer) der weltweiten Bevölkerung zwischen 20 und 79 Jahren an Dm, entsprechend einer Anzahl von 415 Millionen Menschen. Hinzu kamen 542000 Kinder zwischen 0 und 14 Jahren, die an einem Typ 1 Dm erkrankt waren. Die Ziffer der Todesfälle, die auf eine Dm-Erkrankung zurückzuführen waren betrug 500 Millionen. Bis 2040 wird der Anteil diabeteskranker Menschen sogar noch weiter steigen. Schätzwerte belaufen sich auf 10,4% der adulten Weltbevölkerung, was umgerechnet 642 Millionen Menschen entspräche (bei einem Anstieg der Weltbevölkerung auf 9,0 Milliarden Menschen, davon 6,16 Milliarden Menschen zwischen 20 und 79 Jahren) (Cho et al. 2015).

Bei genauerer Betrachtung der Gruppe an Dm erkrankter Menschen fällt auf, dass 87% - 91% der Erkrankten an Typ 2 Dm leiden, 7% - 12% an Typ 1 Dm und 1% - 3% an anderen Diabetesformen. Sowohl in industrialisierten Ländern, als auch in Entwicklungsländern können Prävalenzsteigerungen des Dm verzeichnet werden, was auf die Zunahme der Risikofaktoren für Dm zurückzuführen ist. Zu den Risikofaktoren zählen neben der Alterszunahme der Bevölkerung und der zunehmenden Urbanisierung auch verminderte körperliche Aktivität, ungesunde Ernährung (vermehrte Aufnahme von Zucker und verminderte Aufnahme von

Gemüse und Obst), Übergewicht, Rauchen, Luftschadstoffe sowie strukturelle Deprivation (Cho et al. 2015, Rathmann et al. 2015).

Die jährlichen weltweiten Ausgaben für die Behandlung und die Prophylaxe des Dm belaufen sich geschätzt auf 673 Milliarden bis 1197 Milliarden US Dollar (Cho et al. 2015).

Auch in Deutschland spielt der Diabetes mellitus eine große Rolle im Gesundheitswesen. So waren 2015 ca. 6,5 Millionen Menschen von Dm betroffen. Damit rangiert Deutschland im Moment auf Platz zwei (nach Russland mit 12,1 Millionen Diabetespatienten) der Länder mit der höchsten Anzahl an Dm erkrankter Menschen in Europa (Cho et al. 2015).

Der explosionsartige Anstieg der Dm-Patientenzahlen in der Bevölkerung stellt neben der gesundheitlichen Beeinträchtigung des Einzelnen auch in Deutschland eine enorme finanzielle Belastung für die Gesundheitssysteme dar. So wurden nach einer Auswertung der AOK Gesundheitskasse 2009 21 Mrd. Euro für die medizinische Behandlung von Dm-Patienten ausgegeben. Hierbei wurde der Großteil der Mittel, etwa zwei Drittel, für die Behandlung von diabetischen Folgeerkrankungen verwendet (Rathmann et al. 2015). Im Jahr 2015 gibt die *International Diabetes Federation* für die mit Dm-assoziierten Krankheitskosten in Deutschland sogar einen Betrag von 35 Milliarden US Dollar (entspricht etwa 31,85 Milliarden Euro) an, wobei hier auch Prophylaxemaßnahmen wie Ernährungsberatung enthalten sind (Cho et al. 2015).

## **2.4 Diabetische Folgeerkrankungen**

Die diabetischen Folgeerkrankungen werden in Makro- und Mikroangiopathien unterteilt. Die Makroangiopathien umfassen Herz-Kreislaufferkrankungen und



zerebrovaskuläre Komplikationen, die Mikroangiopathien die diabetische Nephro-, Neuro- und Retinopathie.

### **2.4.1 Makroangiopathien**

Die diabetische Makroangiopathie manifestiert sich v.a. als koronare Herzkrankheit (KHK) mit der möglichen Folge eines Myokardinfarktes, als periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und als zerebrovaskuläre Insuffizienz, bzw. zerebrovaskulärer Insult (Schlaganfall). Allen Komplikationen gemeinsam sind die bei Diabetikern beschleunigt ablaufenden atherosklerotischen Gefäßveränderungen (Lichtenauer et al. 2003).

Im Vergleich zu Nichtdiabetikern ist das Risiko für einen Diabetiker, an der diabetischen Makroangiopathie zu erkranken, zwei bis vierfach erhöht. Etwa drei Viertel aller Diabetiker sterben an Myokardinfarkten bzw. Schlaganfällen aufgrund akuter Gefäßverschlüsse (Rathmann et al. 2015).

Bis zum Auftreten akuter Komplikationen bleiben die meisten Makroangiopathien lange Zeit symptomfrei. Bei der KHK kommt es gehäuft zu unbemerkten Myokardischämien, die zu stillen Myokardinfarkten führen können. Oftmals ist ein akuter Herzinfarkt das erste schmerzhafteste Symptom dieser Erkrankung (Lichtenauer et al. 2003).

Ebenso kann die pAVK lange Zeit beschwerdefrei verlaufen, bis die Durchblutungsstörungen zu Problemen führen. Wenn Komplikationen auftreten kommt es v.a. zu zerebralen Insulten, Gefäßobstruktionen der unteren Extremitäten oder zur KHK (Lichtenauer et al. 2003).

Pathogenetisch gesehen handelt es sich bei atherosklerotischen Gefäßveränderungen um einen Entzündungsprozess der Gefäßwand, an dessen Beginn eine erhöhte Endothelpermeabilität steht. Diese wird vermutlich durch die

erhöhten Glukosespiegel, die bei Dm auftreten, ausgelöst. In Kultur führt die Hyperglykämie zu einer verzögerten Proliferation und einer eingeschränkten Konfluenz der Endothelzellen (Marx 2005). Als Folge der erhöhten Endothelpermeabilität können Plasmabestandteile aus dem Blut wie beispielsweise das C-reaktive Protein (CRP) - ein Entzündungsmediator - und Lipoproteine in die Gefäßwand insudieren.

Durch Aktivierung des Gefäßendothels werden vermehrt Chemokine freigesetzt, die Entzündungszellen (Monozyten, CD4+-Lymphozyten) anlocken. Zudem werden Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM, E-Selektin) an der Endothelzelloberfläche ausgebildet, die die Einwanderung der Entzündungszellen in die Gefäßwand begünstigen.

Die eingewanderten Monozyten entwickeln sich in der Gefäßwand durch die Aufnahme von Lipiden zu sogenannten „Schaumzellen“ und sezernieren ihrerseits weitere Entzündungsmediatoren. Diese Mediatoren verstärken den bereits begonnenen Entzündungsprozess und sorgen zusätzlich dafür, dass glatte Gefäßmuskelzellen aus der Tunica media der Gefäßwand proliferieren und in die Tunica intima einwandern. In diesem Stadium der Atherogenese spricht man von „Fatty-Streak-Formationen“ (Marx 2005).

Durch weitere Ansammlung von Lipiden und Entzündungszellen entwickelt sich mit der Zeit eine Plaque. Proteolytische Vorgänge und Apoptosen führen zur Ausbildung eines nekrotischen Lipidkerns innerhalb der Plaque, der von einer fibrösen Kappe aus Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix umgeben wird und somit vom zirkulierenden Blut abgeschirmt wird.

Bei Diabetikern besteht eine Störung der systemischen Gerinnung und der Plättchenfunktion, was mit einer erhöhten Thrombogenität, einer Hyperkoagulabilität,

sowie einer eingeschränkten Fibrinolyse einhergeht (Marx 2005, Soma und Pretorius 2015).

Kommt es nun zu Einrissen der bei Diabetikern sehr fragilen fibrösen Kappe der Plaque, wird die Gerinnungskaskade aktiviert und Thromben bilden sich aus. Diese können bei Ablösung zu akuten thromb-embolischen Gefäßverschlüssen führen.

Histologisch werden atherosklerotische Alterationen in mehrere Stadien eingeteilt (Perrotta 2013). Zu den ersten mikroskopisch sichtbaren Läsionen zählen Ansammlungen von Lipidtröpfchen und Schaumzellen in der Tunica intima eines Gefäßes, was wiederum zur Verdickung der Intima führt.

In Stadium zwei sind die „Fatty-Streak-Formationen“ zu sehen. Sie bestehen aus Schaumzellen, Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen und bilden gelbliche Streifen auf der Lumenseite der Gefäßwand.

Stadium drei stellt ein Übergangsstadium von den Fatty-Strak-Formationen zu den Atheromen dar. Histologisch lassen sich vermehrt extrazelluläre Lipidakkumulationen erkennen.

Zu Stadium vier schließlich zählen Atherome mit einem Lipidkern und Anhäufungen von Schaumzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen, umgeben von einer dünnen fibrösen Kappe.

Verdickt sich die Kappe spricht man von Fibroatheromen (Stadium fünf). Zusätzlich können Kalzifikationen in den elastischen Fasern der fibrösen Kappe auftreten.

Stadium sechs bezeichnet ulzerierte Atherome und Fibroatherome, die Einrisse an der Oberfläche zeigen und Thromben ausbilden (Santos et al. 2008, Perrotta 2013).

## **2.4.2 Mikroangiopathien**

Zahlreiche diabetische Komplikationen (diabetische Nephropathie, diabetische Neuropathie und diabetische Retinopathie) werden durch pathologische

Veränderungen an den kleinen Gefäßen hervorgerufen (Mikroangiopathien), die mit Störungen des Blutflusses und gesteigerter Gefäßpermeabilität einhergehen. Ebenso treten Kapillarverschlüsse und ein progressiver Verlust von Endothelzellen auf (Brownlee 2001).

Man unterscheidet vier zugrunde liegende Haupt-Pathomechanismen (siehe unten), die sich bei allen Komplikationen ähneln und einen bei Hyperglykämie gemeinsam auftretenden Prozess reflektieren: die Überproduktion reaktiver Sauerstoffradikale in der mitochondrialen Atmungskette.

Die sog. „reactive oxygen species“ (ROS) werden aufgrund einer gesteigerten Produktion von Elektronendonatoren ( $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$ ) und eines veränderten Protonengradienten der Mitochondrienmembran vermehrt gebildet. Sie bedingen die Aktivitätsabnahme des Glykolyse-Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), was zu vermehrtem Abbau von Glukose über den Polyolstoffwechsel-Weg, gesteigerter Bildung sog. „advanced glycation end products“ (AGEs), Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und vermehrter Einschleusung von Glukose in den Hexosaminstoffwechsel-Weg führt (Brownlee 2001).

Steigt die intrazelluläre Glukosekonzentration, was bei chronischer Hyperglykämie der Fall ist, wird Glukose vermehrt in alternativen Stoffwechselwegen abgebaut. Beim Polyolstoffwechsel-Weg wird Glukose über das Enzym Aldose-Reduktase zu Sorbitol umgewandelt und in einem zweiten Schritt durch die Sorbitol-Dehydrogenase zu Fruktose oxidiert. Die Schädigungsmechanismen, die daraus resultieren, beinhalten Sorbitol bedingten osmotischen Stress für die Zelle, verminderte Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase (ein membranständiges Transportprotein zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials), Anstieg der zytosolischen  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ -Ratio und eine Abnahme von NADPH im Zytosol. Hauptaugenmerk wird jedoch auf die Abnahme von NADPH gelegt, da dieses

Stoffwechselprodukt für die Regeneration von Glutathion benötigt wird, dessen Abnahme in oxidativem Zellstress mündet.

Einen weiteren metabolischen Schädigungsmechanismus stellen die AGEs dar. Hierbei handelt es sich um eine Substanzgruppe, die im hyperglykämischen Milieu vermehrt gebildet wird. Makromoleküle wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren werden dabei nichtenzymatisch von reduzierenden Kohlenhydraten glykiert.

Die Anhäufung der AGEs in stark vaskularisierten Organen wie der Niere hat sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Folgen. Modifizierte intrazelluläre Proteine können in ihrer Funktion eingeschränkt sein bzw. neue Funktionen entwickeln. Extrazellulär veränderte Matrixbestandteile zeichnen sich durch eine abweichende Interaktion mit anderen Matrixbestandteilen und Rezeptoren für Matrixproteine aus. Modifizierte Plasmaproteine hingegen binden an AGE-Rezeptoren auf einer Vielzahl von Zellen (Mesangiumzellen, Endothelzellen, Makrophagen) und tragen dadurch zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen bei, die den oxidativen Zellstress fördern (Brownlee 2001, Stirban 2011, Simm et al. 2012).

Die Aktivierung der Proteinkinase C und ihrer Isoformen im hyperglykämischen Milieu erfolgt direkt durch den vermehrt vorliegenden Second Messenger Diacylglycerol (DAG) sowie indirekt über die Bindung der AGEs an ihren Rezeptoren und über den Polyolstoffwechsel-Weg, durch die Zunahme reaktiver Sauerstoffradikale.

Die Folgen sind unter anderem die Unterdrückung der Stickstoffmonoxid (NO) Produktion und die Zunahme der Endothelin-1 Aktivität, was Veränderungen des Blutflusses in Niere und Auge bedingt. Außerdem induziert PKC die Expression von Zytokinen der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF)-Familie, die eine gesteigerte Gefäßpermeabilität verursachen. Des Weiteren induziert PKC den profibrotischen „transforming growth factor  $\beta$ 1“ (TGF- $\beta$ 1), der zu einer gesteigerten Matrixsynthese führt (Brownlee 2001, Rüster und Wolf 2007, Rüster und Wolf 2011).

Der vierte, hyperglykämiebedingte Schädigungsmechanismus beruht auf dem gesteigerten Glukoseabbau im Hexosaminstoffwechsel-Weg. Hierbei wird Glukose zunächst zu Fruktose-6-Phosphat umgewandelt und in weiteren Schritten zu N-Acetylglukosamin. N-Acetylglukosamin wiederum interagiert mit Transkriptionsfaktoren und verursacht dadurch eine gesteigerte Transkription der profibrotischen Faktoren TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  und des prothrombotischen Proteins PAI-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor-1).

#### **2.4.2.1 Diabetische Nephropathie**

Rund 20 – 40% der Diabetiker entwickeln eine diabetische Nephropathie (Rüster und Wolf 2011), die sich meist 10 – 15 Jahre nach Erstdiagnose des Diabetes mellitus manifestiert (Amann und Benz 2007) und die durch das Auftreten einer Albuminurie, einer arteriellen Hypertonie und eines zunehmenden Nierenfunktionsverlustes gekennzeichnet ist (Wolf 2009). Oft mündet die diabetische Nephropathie in einem chronischen Nierenversagen, bei dem die Patienten dialysepflichtig werden. Die diabetische Nephropathie stellt mit 25 – 35% die häufigste Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz dar (Amann et al. 2013).

Histologische Befunde zeigen bei einer Vielzahl der Fälle das Auftreten charakteristischer glomerulosklerotischer Alterationen, die erstmals im Jahr 1936 von Kimmelstiel und Wilson beschrieben wurden (Kimmelstiel und Wilson 1936).

Früheste morphologische Veränderungen der Nieren, wie die Verdickung der glomerulären Basalmembran (GBM), können beim Menschen zwei bis acht Jahre nach der Erstdiagnose des Dm elektronenmikroskopisch diagnostiziert werden (Amann und Benz 2007, Amann et al. 2013). Weitere Alterationen umfassen die Entwicklung einer glomerulären Hypertrophie mit mesangialer Expansion und

Matrixvermehrung und die Abnahme der Zytoplasmasaumbreite von Mesangiumzellen und Podozyten (Helmchen et al. 2006).

Glomeruläre Alterationen lassen sich generell in glomerulär-kapilläre, glomerulär-mesangiale und extraglomeruläre Läsionen untergliedern (Wanke et al. 2001).

Bei Patienten mit Dm umfassen die glomerulär-kapillären Alterationen Hyalinose und Kapillarschlingenkollaps, die glomerulär-mesangialen Veränderungen mesangiale Matrixvermehrung sowie exsudative Läsionen mit Proteinakkumulation im Mesangium. Die extraglomerulären Alterationen zeichnen sich durch Adhäsionen und Synechien zwischen den Blättern der Bowman-Kapsel aus (Amann und Benz 2007, Amann et al. 2013, Hara et al. 2014).

In frühen Stadien der Erkrankung erscheint die mesangiale Matrixzunahme in den Glomerula zumeist panglomerulär. Mit fortschreitender Krankheit münden die Veränderungen in der für Diabetiker typischen nodulären Kimmelstiel-Wilson-Glomerulosklerose. Die zunehmenden Synechien zwischen dem glomerulären Kapillarschlingenkonvolut und dem Epithel der Bowman-Kapsel bzw. die Obliteration der Kapsel führen letztendlich zur Verödung der Glomerula (Amann und Benz 2007, Amann et al. 2013, Hara et al. 2014).

Die glomerulären Kapillaren erscheinen vergrößert und weisen aneurysmatische Bereiche mit fehlendem Endothelbesatz auf. Bei Betrachtung der afferenten und efferenten Gefäße bzw. der Interlobulararterien der Niere können hyaline Wandabschnitte gefunden werden, die als „Arteriolo-hyalinose“ bezeichnet werden (Helmchen et al. 2006).

Das Tubulointerstitium zeigt zu Beginn der diabetischen Nephropathie eine tubuläre Hypertrophie mit Verdickung der tubulären Basalmembranen. Im späteren Krankheitsverlauf sind die Tubulusatrophie und die interstitielle Fibrose mit Begleitentzündung (häufig sind Lymphozyten, Plasmazellen und neutrophile bzw.

eosinophile Granulozyten zu sehen) die häufigsten Befunde (Helmchen et al. 2006, Amann et al. 2013)

Als Auslöser für die Entwicklung glomerulosklerotischer Alterationen wurden verschiedene pathogenetische Leitkonzepte diskutiert. Das Konzept der glomerulären Hyperfunktion, das auf einer ursächlichen Hyperperfusion und Hyperfiltration der Glomerula beruht (Brenner 1983), das Konzept der veränderten glomerulären Permeabilität, das einen abnormen Übertritt von Plasmaproteinen durch die Filtrationsbarriere der Glomerulumkapillaren als Ursache für die Entwicklung der Glomerulosklerose ansieht (Remuzzi und Bertani 1990) und das Konzept der durch Wachstumsfaktoren ausgelösten glomerulären Hypertrophie (Fogo und Ichikawa 1989) erreichten dabei die meiste Anerkennung.

Nach derzeitigem Forschungsstand wird davon ausgegangen, dass der Glomerulosklerose eine glomeruläre Hypertrophie mit Größenzunahme der extrazellulären Matrix und Hypertrophie bzw. Hyperplasie der mesangialen und endothelialen Zellen vorausgeht. Die glomeruläre Hypertrophie geht mit einer Längenzunahme und Lumenvergrößerung der glomerulären Kapillaren einher. Diese Längenzunahme beeinflusst v.a. die glomerulären Podozyten. Podozyten sind hoch differenzierte postmitotische Zellen, die mit ihren Fußfortsätzen der glomerulären Basalmembran aufsitzen und die Schlitzmembran der Filtrationsbarriere bilden. Befunde in einem diabetischen Mausmodell zeigen, dass es bereits vor der Vergrößerung des Glomerulums (Hypertrophie) zu einer Hypertrophie der Podozyten kommt (Herbach et al. 2009), was im weiteren Verlauf zur Abflachung und Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten („foot process effacement“), zur Ablösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran (Denudation der GBM) und zum Untergang zunächst einzelner Zellen führt. Die verbleibenden Podozyten „versuchen“ den Verlust durch fortschreitende Hypertrophie



auszugleichen, was die Vulnerabilität der Zellen erhöht und zu einer weiteren Abnahme der Zellen führt. Ist eine Kompensation durch die verbliebenen Podozyten nicht mehr möglich, kommt es zur Denudation der GBM und zu Lücken in der Schlitzmembran, was die Filtrationseigenschaft der Nieren beeinträchtigt und zur Ausscheidung von Proteinen in den Urin (Proteinurie) führt. Parietale Epithelzellen schließen als Anpassungsreaktion die Lücken in der Schlitzmembran. Die dadurch entstehenden Adhäsionen zwischen der glomerulären Basalmembran und der Bowman'schen Kapsel tragen zum Fortschreiten der Glomerulosklerose und dem Auftreten einer Proteinurie bei. Zudem kommt es vermehrt zur Filtration in das periglomeruläre Gewebe, was aufgrund des fibrogenen Effekts der Plasmabestandteile zu tubulointerstitiellen Läsionen führt (Wanke et al. 2001, Kriz 2003, Reidy und Susztak 2009).

Auf molekularer Ebene sind bei Dm verschiedene, im hyperglykämischen Milieu auftretende Auslöser für das Auftreten der Nierenalterationen verantwortlich. Außerdem werden zunehmend auch genetische Faktoren als wichtige prädisponierende Komponenten der diabetischen Nephropathie angesehen.

So wird beispielsweise dem ACE (angiotensin converting enzyme)-Insertions-Deletions-Polymorphismus eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Nierenveränderungen beigemessen. Patienten, die das D-Allel des ACE-Gens tragen und somit den ACE-D/D-Genotyp aufweisen, haben nachweislich eine erhöhte ACE-Enzymaktivität und sprechen schlechter auf eine Therapie mit ACE-Inhibitoren an (Wolf 2005, Rüster und Wolf 2007).

Sogenannte „Non Progressors“ entwickeln auch nach 15 Jahren manifestem Diabetes mellitus keine Nierenschäden und gelten als „genetisch vor der diabetischen Nephropathie geschützt“ (Rüster und Wolf 2011).

Zu den metabolischen Schädigungsmechanismen bei Dm zählen die oben genannten Pathomechanismen (siehe 2.4.2), die durch die gesteigerte Bildung der ROS zustande kommen und auch ihrerseits die Bildung der ROS fördern. Außerdem entstehen die freien Radikale bei Dm zusätzlich durch den Anstieg der ROS-bildenden Enzyme (z.B. NOX (NAD(P)H-Oxidase)) im hyperglykämischen Milieu und durch die verminderte Aktivität antioxidativer Systeme in der Niere (Marco et al. 2015). Durch ihre zytotoxischen Effekte tragen die ROS zur Entstehung der Entzündungsprozesse und der Fibrose in der Niere bei. (Rüster und Wolf 2007, Rüster und Wolf 2011, Marco et al. 2015).

Auch die Anhäufung von AGEs in der Niere wirkt sich sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär auf die Pathogenese der diabetischen Nephropathie aus.

Intrazellulär agieren AGEs mit ihrem Rezeptor (RAGE), dessen Expression bei Diabetikern stark gesteigert ist, sowie weiteren Bindungsproteinen. Die daraus resultierenden Modifikationen von Signalwegen beeinflussen letztendlich die Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor kappa B“ (NF- $\kappa$ B) bedingt beispielsweise einen Anstieg der Matrixproduktion und proinflammatorischer Zytokine. Ein weiteres Beispiel ist die Anregung der Produktion der Proteinkinase C (PKC) in der Niere. Die in 2.4.2 genannten Folgen dieser Enzymaktivierung (Induktion des profibrotischen TGF- $\beta$ 1, Beeinflussung von Blutfluss und Kapillarpermeabilität) tragen zum Erscheinungsbild der Erkrankung bei. So werden Zytokine der VEGF-Familie beispielsweise mit der Hyperpermeabilität der Kapillaren und dem Fortschreiten der Albuminurie bei Diabetikern in Verbindung gebracht (Chen und Ziyadeh 2008, Veron et al. 2011).

Extrazellulär reagieren AGEs mit Matrixproteinen (z.B. Kollagen Typ IV, Fibronektin, Proteoglykanen) und verursachen dadurch, dass diese durch Metalloproteinasen

schlechter abgebaut werden können und dass sich deren Ladungseigenschaften ändern. Die Akkumulation der Matrixproteine führt unter anderem zu einer Verdickung der glomerulären Basalmembran, die zudem durch den Verlust der Elektronegativität der Proteoglykane ihre ladungsabhängigen Filtrationseigenschaften verliert (Rüster und Wolf 2011, Simm et al. 2012).

Die hämodynamischen Veränderungen, die vermehrt bei einem Diabetiker auftreten, tragen ihrerseits zur Progression der Nierenalterationen bei. Sie umfassen systemischen Bluthochdruck, intraglomeruläre Hypertonie mit Hyperfiltration und Hyperperfusion und vermehrte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (Marco et al. 2015).

Als wichtigster Mediator der hämodynamischen Schädigungen gilt Angiotensin II, das bei der diabetischen Stoffwechsellage durch verstärkte Aktivierung des systemischen und - weitaus wichtiger - des lokalen Renin-Angiotensin-Systems in der Niere vermehrt von Tubuluszellen gebildet wird (Rüster und Wolf 2011). Durch Beeinflussung der Tonizität efferenter Arteriolen mit vermehrter Vasokonstriktion dieser Gefäße kommt es zu einer gesteigerten Perfusion der Glomerula und glomerulärem Hochdruck. Der mechanische glomeruläre Stress führt zur gesteigerten Synthese des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ , der seinerseits hämodynamische Effekte aufweist: durch Induktion einer gesteigerten NO-Produktion kommt es zu einer Vasodilatation der afferenten Arteriolen und einer Verstärkung des mechanischen Stresses im Glomerulum (Rüster und Wolf 2007, Yacoub und Campbell 2015).

Die gesteigerte Synthese von Angiotensin II in den Tubuluszellen der Nieren hat auch weitreichende metabolische Effekte, die die Glomerulosklerose vorantreiben. So wirkt Angiotensin II als Stimulator von proinflammatorischen und profibrotischen

Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Wolf 2005, Rüster und Wolf 2007, Yacoub und Campbell 2015).

#### **2.4.2.2 Diabetische Neuropathie**

Jeder dritte Diabetiker (ca. 30%) leidet an einer Form der diabetischen Nervenerkrankung (Reiners und Haslbeck 2006, Ziegler 2012, Rathmann et al. 2015).

Abhängig von der Lokalisation der Erkrankung wird die diabetische Neuropathie in die periphere Neuropathie (das willkürliche Nervensystem betreffend) und in die autonome Neuropathie (das vegetative Nervensystem betreffend) unterteilt (Rathmann et al. 2015).

Die periphere Neuropathie äußert sich am häufigsten in der distal-symmetrischen sensomotorischen Neuropathie (DSPN). Diese geht einher mit brennenden Schmerzen in den unteren Extremitäten, Sensibilitätsstörungen, fehlenden Muskeleigenreflexen und Gangunsicherheit (Ziegler 2008 b, Rathmann et al. 2015). Durch mangelhafte Wahrnehmung von Druckstellen oder Verletzungen an den Füßen können außerdem Ulzera und nicht heilende Wunden entstehen (diabetisches Fußsyndrom) (Rathmann et al. 2015).

Weitaus seltener treten asymmetrische fokale bzw. multifokale diabetische Neuropathien auf. Hierbei sind einzelne Nerven (Mononeuropathie) oder mehrere benachbarte Nerven (Plexusneuropathie) betroffen. Bei der Mononeuropathie des Nervus oculomotorius beispielsweise treten retroorbitale Schmerzen auf, die mit dem Sehen von Doppelbildern einhergehen (Reiners und Haslbeck 2006, Ziegler 2008 b). Die autonome Neuropathie hingegen kann alle vegetativ innervierten Organe betreffen. Am anfälligsten sind dabei das Herz-Kreislaufsystem, der Gastrointestinaltrakt sowie das Urogenitalsystem (Ziegler 2008 a).

Symptome wie plötzlicher Blutdruckabfall beim Aufstehen mit Schwindel und Synkopen, Erbrechen, Durchfall, Obstipation, Harninkontinenz und erektile Dysfunktion sind die Folge (Ziegler 2008 a, Rathmann et al. 2015).

Histologisch findet man bei der diabetischen Neuropathie einen Nervenfaserschwund, also eine Degeneration der Axone, sowie einen Markscheidenschwund – die sog. Demyelinisierung (Said 2007, Anzil 2012, Sanada et al. 2015). Diese kann primär auftreten, wenn die Schwannzellen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, oder sekundär, wenn keine axonale Kontrolle der Myelinisierung mehr besteht (dann zeigt sich die Demyelinisierung eher segmental) (Said 2007). Beides kann im hyperglykämischen Milieu bei Diabetikern beobachtet werden.

Außerdem sind Remyelinisierungsvorgänge, eine Proliferation der Schwannzellen, eine Loslösung der Axone von den Schwannzellen und Verdickungen der Basalmembranen zu sehen. Die sog. „onion bulb“ Formationen (Zwiebelring-Formationen) sind eine weitere typische Alteration bei Dm (Said 2007, Sanada et al. 2015). Hierbei bilden sich mehrere Schichten von Schwannzellfortsätzen um das Axon aus, die die Folge einer wiederholten segmentalen Demyelinisierung mit nachfolgender Regeneration des Myelins darstellen.

Bei Betrachtung der neuronalen Gefäßversorgung fällt eine Reduktion der Dichte endoneuraler Kapillaren auf sowie die für die diabetische Mikroangiopathie typische Verdickung der Basalmembranen (Malik et al. 2005, Said 2007).

Die Veränderungen von Kapillaren (Verdickung der Basalmembranen, Ausbildung hyaliner Wandabschnitte), die zu ischämischen Zuständen an den Nerven führen können, sind v.a. für die fokalen Formen der diabetischen Neuropathie verantwortlich. Dabei führt die verminderte Perfusion zu Entzündungsprozessen und Läsionen an den betroffenen Nerven (Thomas 1999, Said 2007).

Im Gegensatz dazu werden für die distal symmetrische Neuropathie überwiegend metabolische Schädigungsmechanismen verantwortlich gemacht.

Ähnlich wie die diabetische Nephropathie unterliegt auch die Neuropathie einer multifaktoriellen Pathogenese. Neben den in 2.4.2 genannten Pathomechanismen (Sorbitolanreicherung durch gesteigerten Polyolstoffwechsel-Weg, AGE-Formierung, Aktivierung der PKC, veränderte Gentranskription durch Einschleusung von Glukose in den Hexosaminstoffwechsel-Weg), werden auch Störungen der Blutversorgung der Nerven über die Vasa nervorum sowie Störungen im Metabolismus von n-6-essentiellen Fettsäuren und Prostaglandinen für die Erkrankung verantwortlich gemacht. Hinzu kommen eine verminderte endogene Produktion des Wachstumsfaktors IGF-1 (insulin-like growth factor 1) und immunologische Mechanismen mit der Bildung von Antikörpern gegen Bestandteile des Nervengewebes (Bondy et al. 1994, Lechleitner et al. 2012).

Die gesteigerte Bildung schädigender ROS in den Mitochondrien der Nervenzellen führt zu deren Schädigung und oxidativem Zellstress. Dabei sind v.a. die Mitochondrien sensibler Nerven in den Dorsalwurzelganglien anfällig für Schädigungen (Said 2007).

Die vermehrt gebildeten AGEs führen über Interaktion mit Rezeptoren und Bindungsproteinen zur Induktion von Monozyten und Endothelzellen, die ihrerseits vermehrt Zytokine und Adhäsionsmoleküle bilden (Thomas 1999, Said 2007, Sveen et al. 2013). Außerdem können AGEs Tubulin und Neurofilamente in den Axonen und Myelin in den Schwannzellen modifizieren. Extrazellulär werden Bestandteile der extrazellulären Matrix und der Basalmembranen (Kollagen, Laminin und Fibronektin) glykiert, die folglich eine erhöhte Rigidität aufweisen und anfälliger für mechanische Schädigungen sind (Thomas 1999). Außerdem hat die Glykierung Effekte auf die Matrix-Metalloproteinasen. Zusammengenommen beeinträchtigen die veränderten

Matrixproteine die Regeneration beschädigter Axone (Said 2007, Kundalic et al. 2014).

Auch der bei Diabetikern gestörte Stoffwechsel von essentiellen Fettsäuren, die für die Aufrechterhaltung einer physiologischen Zellwand wichtig sind, führt zu einer Änderung der Struktur der Nervenmembranen (Thomas 1999, Lechleitner et al. 2012).

Die abnorme Produktion des IGF-1 im hyperglykämischen Milieu schließlich, trägt ebenso zum Erkrankungsbild bei. Die Wachstumsfaktoren der IGF-Familie haben u.a. auch verschiedene neurotrophe Funktionen, wie die Kontrolle des Fortbestandes der Neuronen, des Neuritenwachstums, der neuronalen Regeneration und der Expression von Genen, die für axonale Proteine des Zytoskeletts (Tubulin, Neurofilamente) kodieren. Der Mangel an IGF-1 trägt dazu bei, dass die Nervenzellen die distalen Bereiche ihrer Axone nicht erhalten können und die Regeneration dieser Abschnitte gestört ist (Thomas 1999, Dobretsov et al. 2007).

#### **2.4.2.3 Diabetische Retinopathie**

Die diabetische Retinopathie tritt nach 20 jähriger Diabetesdauer bei nahezu allen Patienten (95%) mit Typ 1 Diabetes mellitus und bei über 50% der Patienten mit Typ 2 Dm auf. Die Erkrankung ist für 14 – 17% aller Erblindungen in Deutschland verantwortlich (Nentwich und Ulbig 2010).

Man unterscheidet zwei Erkrankungsbilder der diabetischen Retinopathie: die diabetische Makulopathie und die diabetische Retinopathie. Bei der diabetischen Makulopathie, die isoliert auftreten kann, jedoch häufig mit der diabetischen Retinopathie gemeinsam diagnostiziert wird, kommt es zu einem Makulaödem in der Netzhaut.

Die diabetische Retinopathie wird nochmals in zwei Stadien unterteilt: die nichtproliferative und die proliferative Retinopathie.

Pathogenetisch führen metabolische Schädigungsmechanismen aufgrund der hyperglykämischen Stoffwechsellage (siehe 2.4.2) zu Läsionen an den Kapillaren. Folglich kommt es zu hämodynamischen Veränderungen wie gesteigerter Gefäßpermeabilität und zunehmender Kapillarokklusion (klinisches Bild der Makulopathie und nichtproliferativen Retinopathie). Liegt eine hochgradige Netzhautischämie vor, treten vermehrt Gefäßneubildungen der Netzhaut auf, die zu Glaskörperblutungen und Netzhautablösung führen (klinisches Bild der proliferativen Retinopathie) (Lemmen und Bornfeld 2008, Nentwich und Ulbig 2010).

## **2.5 Diagnostik diabetischer Folgeerkrankungen**

Diabetische Folgeerkrankungen zeigen sich häufig erst Jahre nach der Erstdiagnose des Diabetes mellitus. Die Patienten bleiben lange Zeit frei von klinischen Symptomen, was ein großes Problem in der Diagnostik der Alterationen darstellt. Frühstadiale Veränderungen bleiben oft unerkannt und somit auch unbehandelt. Wenn Symptome auftreten ist die Erkrankung meist schon weit fortgeschritten und mit großen Risiken für die Patienten behaftet. Daher ist es von großer Bedeutung, die diabetischen Organveränderungen frühestmöglich zu erfassen und zu therapieren.

### **2.5.1 Diabetische Makroangiopathie**

Die diabetische Makroangiopathie bleibt oftmals lange Zeit symptomfrei. Um ein Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten, ist es wichtig, bereits frühe Stadien zu diagnostizieren. Daher wird bei Diabetikern ab 35 Jahren einmal jährlich die Anfertigung eines Ruhe-Elektrokardiogramms (EKG) empfohlen. Zeigt das EKG Auffälligkeiten, liegen bereits andere diabetische Folgeerkrankungen vor oder



besteht eine Hypercholesterinämie, wird eine weiterführende kardiale Diagnostik eingeleitet. Hierzu zählen Belastungs-EKG, Ultraschalluntersuchung des Herzens in Ruhe und unter Belastung, Bestimmung des Verhältnisses der Tunica intima zur Tunica media der Arteria carotis mittels Ultraschall, Myokardszintigraphie und Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

Zu den invasiven Methoden zählen Herzkatheteruntersuchungen wie die Koronarangiographie und die intravaskuläre Ultraschalluntersuchung. Sie sind der Goldstandard bei der Diagnose der diabetischen Makroangiopathie (Scherbaum 2005, Stirban und Tschoepe 2008).

### **2.5.2 Diabetische Nephropathie**

Die Diagnostik der diabetischen Nephropathie beruht auf mehrmaligen Messungen der Proteinausscheidung (v.a. des Albumins) im Urin und auf der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate. Bei Typ 1 Diabetikern wird das Albuminurischescreening nach fünf Jahren manifestem Diabetes durchgeführt, bei Typ 2 Diabetikern ab Feststellung des Dm. Anhand der Befunde wird die Erkrankung dann in Stadien eingeteilt (Meier und Haller 2004, Wolf und Zeier 2007), die in Tabelle 2 aufgelistet sind.

**Tabelle 2: Stadien der diabetischen Nephropathie**

Stadium	Beschreibung	Albuminausscheidung (mg/l)	GFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	Assoziierte Begleiterkrankungen
<b>1</b>	<b>Nierenschädigung mit normaler Nierenfunktion</b>			Serumkreatinin normal; Blutdruck im Normalbereich, steigend, oder Hypertonie; Dyslipidämie; Progression von KHK, AVK; Retinopathie und Neuropathie
1a	Mikroalbuminurie	20-200	>90	
1b	Makroalbuminurie	>200		
<b>2</b>	<b>Nierenschädigung mit Niereninsuffizienz</b>			Serumkreatinin grenzwertig oder erhöht; häufigere Progression von KHK, AVK; Retinopathie und Neuropathie; Anämieentwicklung; Störung des Knochenstoffwechsels
2a	Leichtgradige NI	>200	60-89	
2b	Mäßiggradige NI	Abnehmend	30-59	
2c	Hochgradige NI		15-29	
2d	Terminale NI		<15	

**AVK** arterielle Verschlusskrankheit, **GFR** glomeruläre Filtrationsrate, **KHK** koronare Herzkrankheit, **NI**

Niereninsuffizienz. Tabelle modifiziert nach Meier und Haller (2004).

Bei atypischem Krankheitsverlauf (Einsetzen einer Proteinurie < 5 Jahre nach Beginn des Dm, akuter Beginn und/oder beschleunigter bzw. rasch progredienter Verlauf der Nierenerkrankung, nephritisches Urinsediment, Nierensymptomatik in Abwesenheit einer diabetischen Retinopathie bei langjährigem Typ 1 Dm) kann eine Nierenbiopsie Klarheit liefern. Die morphologischen Befunde der Biopsien werden in Klassen eingeteilt (Tervaert et al. 2010, Amann et al. 2013):

**Klasse I:** milde oder unspezifische lichtmikroskopische Veränderungen und Verdickung der glomerulären Basalmembran in der Elektronenmikroskopie (weibliche Patienten: > 395 nm; männliche Patienten: > 430 nm, jeweils älter als 9 Jahre)

**Klasse II:** IIa: leichte Mesangiumverbreiterung (durch Matrixexpansion und/oder Zellvermehrung): >25% der Mesangiumfelder sind breiter als 2 Mesangiumzellkerne

IIb: schwere Mesangiumverbreiterung (durch Matrixexpansion und/oder Zellvermehrung): >25% der Mesangiumfelder sind mindestens so breit wie eine durchschnittliche Kapillarlichtung

**Klasse III:** Noduläre Glomerulosklerose (Kimmelstiel-Wilson) mit  $\geq 1$  eindeutigen Mesangiumknoten

**Klasse IV:** Fortgeschrittene diabetische Glomerulosklerose: globale Glomerulosklerose von > 50% der Glomerula, außerdem morphologische Hinweise auf diabetische Nephropathie im übrigen Parenchym (Veränderungen vom Typ der Klassen I, II oder III) oder klinisch anzunehmende diabetische Nephropathie, z.B. bei gesicherter diabetischer Retinopathie bzw. Ausschluss einer nichtdiabetischen Ursache.

### 2.5.3 Diabetische Neuropathie

Die Erstuntersuchung auf diabetische Neuropathie erfolgt ähnlich wie bei der diabetischen Nephropathie bei Typ 2 Diabetikern bei Diagnosestellung, bei Typ 1 Diabetikern nach fünfjähriger Diabetesdauer (Lechleitner et al. 2012).

Nach einer ausführlichen Anamnese, bei der die Patienten nach auftretenden neurologischen Symptomen wie Schmerzen und Parästhesien befragt werden, erfolgt eine klinische Untersuchung zur Erfassung des neurologischen Basisstatus. Hierzu zählen z.B. Reflexprüfung, Überprüfung des Temperaturempfindens und Beurteilung des Lagesinnes. Anhand der Befunde und unter Verwendung von sog. Neuropathie-Scores - Neuropathie-Symptom-Score (NSS) und Neuropathie-Defizit-Score (NDS), aufgelistet im Anhang unter 9.1 und 9.2- wird dann entschieden, ob eine periphere diabetische Neuropathie vorliegt (Ziegler 2008 b, Lechleitner et al. 2012).

Liegt ein NDS-Score von 6-8 vor oder ein NDS von 3-5 zusammen mit einem NSS von 4-6, gilt eine periphere diabetische Neuropathie als diagnostiziert (Lechleitner et al. 2012).

Da die klinische Untersuchung jedoch nur weit fortgeschrittene und symptomatische Stadien der diabetischen peripheren Neuropathie erfassen kann, ist der Einsatz apparativer und invasiver diagnostischer Methoden oftmals notwendig.

Zur apparativen Diagnostik zählen elektrophysiologische Methoden (Messung von Nervenleitgeschwindigkeit und Aktionspotentialen mittels Elektroneurographie bzw. Elektromyographie), sowie quantitative sensorische Tests zur Bestimmung der absoluten sensorischen Schwelle (Messung der Wahrnehmungsschwelle für Hitze und Kälte, mechanischen Schmerz, Druck-Berührung, Vibration und elektrischen Strom) (Reiners und Haslbeck 2006, Ziegler 2008 b).

Unter den invasiven Methoden zählt die Hautbiopsie an den unteren Extremitäten mit Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte zum Goldstandard bei der Diagnostik der diabetischen Neuropathie. Hierbei wird der Verlust von Nervenfasern morphometrisch ermittelt. Der Nervenfaserverlust kann vor dem Auftreten klinischer Symptome einen Hinweis auf das Vorliegen einer diabetischen Neuropathie geben (Ziegler 2014).

Die Diagnostik der autonomen diabetischen Neuropathie richtet sich nach dem betroffenen Organsystem, welches beim Auftreten von Symptomen organspezifischen Tests unterzogen wird. Als einfache klinische Hinweise auf das Vorliegen einer autonomen diabetischen Neuropathie gelten eine Verminderung der Herzfrequenzvariabilität im Orthostaseversuch und bei Inspiration ebenso wie ein deutlicher Blutdruckabfall im Aufstehversuch (Lechleitner et al. 2012).

## **2.5.4 Quantitativ-morphologische Analyseverfahren bei der Diagnostik frühstadialer diabetischer Veränderungen**

Betrachtet man die Entwicklung der Diagnostik diabetischer Folgeerkrankungen, wird deutlich, dass v.a. bei den Mikroangiopathien die diagnostischen Methoden immer häufiger auf quantitativ-morphologischen Untersuchungen basieren. Die Bestimmung der Basalmembrandicke bei der diabetischen Nephropathie, oder die Ermittlung der intraepidermalen Nervenfaserdichte bei der diabetischen Neuropathie sind Beispiele für den Einsatz quantitativ-morphologischer Untersuchungsmethoden.

Beide dienen der Früherkennung der diabetischen Folgeerkrankungen, was für die Patienten einen großen Nutzen darstellt. Denn eine Erkrankung kann nur optimal therapiert werden und das Fortschreiten verlangsamt werden, wenn sie bereits in den Anfangsstadien diagnostiziert wird.

Auch wenn klinische Untersuchungen und apparative Methoden an ihre Grenzen stoßen (v.a. bei atypischen Krankheitsverläufen bzw. bei der Diagnostik frühstadialer, symptomloser Veränderungen) kommen invasive Methoden mit der Entnahme von Gewebebiopsien zum Einsatz, die mithilfe von Methoden der quantitativen Stereologie untersucht werden. Ein Nachteil der invasiven Methoden ist das höhere Risiko für das Auftreten von Komplikationen während des Eingriffs und der postoperativen Phase. Die Entscheidung für einen invasiven Eingriff erfolgt daher erst nach gründlicher Abwägung der Vor- und Nachteile und nachdem alle nicht invasiven diagnostischen Methoden angewendet wurden. Oftmals wird die Gewebeprobe dann erst in einem Spätstadium der Erkrankung entnommen, was die therapeutischen Möglichkeiten einschränkt.

Der Begriff Stereologie (griechisch: „stereos“ = „Raum“ und „logos“ = „Theorie, Lehre“) umfasst Methoden, die auf Basis zweidimensionaler Abbildungen (z.B. Gewebeschnitte) eines dreidimensionalen Objekts Informationen über dessen

räumliche Struktur gewinnen (Wanke 2016). Dabei werden z.B. Parameter wie Volumen, Anzahl, Länge und Oberfläche geschätzt (Nyengaard 1999, Altunkaynak et al. 2012). Oftmals wird der Begriff Morphometrie als synonym für die Stereologie verwendet. Morphometrische Untersuchungen dienen der quantitativen Erforschung morphologischer Strukturen und sind stets quantitative, nicht jedoch zwangsläufig dreidimensionale Analysen. Im Gegensatz dazu sind stereologische Verfahren immer dreidimensionale, nicht jedoch zwangsläufig quantitative Analysen. Die Differenzierung in qualitativ-stereologische Methoden (z.B. die Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur eines Organs aus Gewebeschnitten) und quantitativ-stereologische Methoden (z.B. Bestimmung der Volumendichte insulinproduzierender  $\beta$ -Zellen im Pankreas auf Grundlage immunhistochemisch behandelter Gewebeschnitte) wurde daher etabliert. Die stochastische Geometrie bzw. die Wahrscheinlichkeitstheorie stellen die theoretische Grundlage der quantitativen Stereologie dar (Wanke 1996, Blutke 2016).

Mithilfe der Stereologie können somit Schätzwerte eines Organs oder einer Organstruktur erhoben werden, die nicht auf subjektiver Einschätzung beruhen, sondern objektiv den Zustand der untersuchten Struktur beschreiben. Gerade bei frühstadialen Veränderungen ist diese Objektivität von großer Bedeutung, da häufig Strukturen außerhalb des subjektiv erkennbaren Bereichs untersucht werden, deren Veränderungen subjektiv nicht erkannt werden können. Auch für die Erstellung von Referenzwerten (z.B. die physiologische Dicke der glomerulären Basalmembran) sind objektive Untersuchungsmethoden wichtig (Ramage et al. 2002). Anhand dieser Referenzwerte können dann pathologische Veränderungen erkannt werden.

## **2.6 Tiermodelle in der Diabetes mellitus-Forschung**

Zahlreiche Tiermodelle wurden für die Erforschung des Diabetes mellitus und seiner Komplikationen geschaffen. Bei den meisten Modellen handelt es sich dabei um Nagermodelle mit Mäusen und Ratten. Doch auch Großtiermodelle (Schweine, Primaten, Hunde, Katzen) gewinnen aufgrund ihrer größeren physiologischen Ähnlichkeit zum Menschen immer mehr an Bedeutung.

Das ideale Tiermodell für Dm sollte humane pathophysiologische Vorgänge widerspiegeln und diabetische Komplikationen in gleichem Umfang wie beim Menschen entwickeln (Cefalu 2006).

Derzeit existiert noch kein Tiermodell, das alle oben genannten Bedingungen erfüllt, v.a. in Hinsicht auf die Entstehung diabetischer Folgeerkrankungen (Cefalu 2006, Islam 2013, Betz und Conway 2016). Zwar wurden viele verschiedene Modelle entwickelt, die bestimmte Aspekte des Dm beim Menschen entwickeln, keines zeigt jedoch die gesamte Spektrum der Dm-assoziierten Veränderungen.

Die Vielzahl der diabetischen Tiermodelle wird in Hinblick auf die Entstehung des Dm in verschiedene Kategorien eingeteilt (Chatzigeorgiou et al. 2009):

- Spontane Modelle, die den Dm spontan, ohne äußere Einwirkung entwickeln.
- Experimentell generierte Modelle, bei denen der Diabetes mellitus durch medikamentöse, fütterungsbedingte oder chirurgische Maßnahmen ausgelöst wird.
- Genetisch modifizierte Modelle, die die Erkrankung aufgrund genetischer Manipulation entwickeln. Diese können nochmals unterteilt werden in transgene Tiere, bei denen ein Fremdgen ins Genom eingefügt wurde, Knockout-Tiere, bei denen ein bestimmtes Gen inaktiviert wurde und sog. Mutanten, bei denen durch mutagene Substanzen zufällig auftretende Mutationen erzeugt wurden, die an die Nachkommen vererbt werden.

Im folgenden Kapitel werden die gängigsten Tiermodelle, mit besonderem Augenmerk auf Maus- und Schweinemodelle, dargestellt.

### **2.6.1 Nagermodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus**

Am häufigsten werden für wissenschaftliche Studien Nagetiere als Tiermodelle (v.a. Mäuse und Ratten) verwendet. Vorteile sind die platzsparende und kostengünstige Haltung, auch bei einer großen Anzahl an Tieren, die kurze Reproduktionszeit und die Möglichkeit, das Genom der Tiere im Vergleich zu anderen Tieren relativ leicht zu manipulieren. Ein weiterer Vorteil von Mausmodellen ist, dass das Genom dieser Tiere komplett entschlüsselt ist.

Die Vielzahl der diabetischen Nagermodelle wird unterteilt in Modelle, die der Erforschung des Typ 1 Dm dienen und solche, die für die Untersuchung des Typ 2 Dm verwendet werden. Zudem gibt es Modelle, die für Studien der diabetischen Folgeerkrankungen verwendet werden.

#### **2.6.1.1 Nagermodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus Typ 1**

##### Spontane Modelle

Zu den gängigsten Nagermodellen, die einen autoimmunen Diabetes mellitus Typ 1 spontan entwickeln, zählen die NOD (non-obese diabetic) Maus, die BB (biobreeding) Ratte, die LETL (Long-Evans Tokushima lean) Ratte und die LEW.1AR1/Ztm-iddm Ratte (ein spontan auftretendes Modell der kongenen Lewis Ratte) (Chatzigeorgiou et al. 2009, King 2012).

Die NOD Maus wurde vor 30 Jahren in Japan entwickelt und stammt von einem kataraktanfälligen Inzuchtstamm (Jcl:ICR) ab. Vor allem die weiblichen Tiere zeigen bereits mit 3-4 Wochen eine T-Zell medierte Insulitis, die zur Zerstörung der  $\beta$ -Zellen



des Pankreas führt. Klinisch manifester Diabetes mellitus tritt auf, wenn 90% der  $\beta$ -Zellen zerstört sind. Ohne Insulinsubstitution sterben die Mäuse an Dehydratation.

Die NOD Maus entwickelt wie der Mensch Autoantikörper gegen Insulin, die zur Schwere der Erkrankung beitragen. Außerdem sind viele Gene der NOD Maus, die mit der Anfälligkeit für Typ 1 Dm verknüpft sind, ähnlich denen beim Menschen. So beispielsweise das zum Menschen homologe MHC (major histocompatibility complex) Allel.

Die NOD-Maus wird als Ausgangsmodell für weitere Mausmodelle verwendet. In sog. humanisierten Modellen beispielsweise werden NOD-Mäuse genetisch modifiziert und exprimieren Komponenten des menschlichen Immunsystems, was zur Erforschung von Autoimmunerkrankungen beiträgt. Bei Transfer-Modellen werden z.B. T-Zellen von NOD-Mäusen in nicht diabetische Empfängermäuse injiziert, die daraufhin einen Diabetes mellitus entwickeln (Chatzigeorgiou et al. 2009, Van Belle et al. 2009, King 2012).

#### Medikamentös induzierter Dm

Streptozotizin (STZ) und Alloxan sind toxische Glukose-Analoga, die sich in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas über den Glukose-2-Transporter anreichern und diese über die Erzeugung freier Radikale zerstören. Die Tiere entwickeln folglich Hyperglykämie und Hypoinsulinämie.

Aufgrund der sehr schmalen Dosierungsbreite von Alloxan wird hauptsächlich STZ für die Induktion des Typ 1 Dm verwendet. Unterschiedliche Dosierungsprotokolle stehen dafür zur Verfügung:

- Einmalige Applikation in hoher Dosierung (100 – 200 mg/kg Körpergewicht bei Mäusen (King 2012)).

- Mehrmalige (über fünf Tage) Applikation geringerer Dosen (20 – 40 mg/kg Körpergewicht bei Mäusen (King 2012)).

Bei Verabreichung einer einmalig hohen Dosis STZ entwickeln die Tiere schwere Hyperglykämien in kurzer Zeit, jedoch treten toxische Organschäden auf und die Mortalitätsrate der Tiere nach der Injektion ist sehr hoch.

Das Protokoll mit mehrmaliger Verabreichung von geringen Dosen STZ verursacht einen langsam voranschreitenden Zelltod der  $\beta$ -Zellen, der zusammen mit einer Insulitis auftritt. Neben der direkten toxischen Wirkung von STZ wird bei geringen Dosen STZ die Expression von Autoantikörpern gegen die Glutamat-Decarboxylase induziert. Diese wiederum triggern eine autoimmune Entzündungsreaktion spezifisch für  $\beta$ -Zellen (Van Belle et al. 2009, King 2012, O'Brien et al. 2014).

Ein Nachteil der Dm-Induktion mit STZ ist die Organtoxizität und Kanzerogenität der Substanz, die zahlreiche Nebenwirkungen – u.a. Schäden an den Nieren und der Leber – verursacht (Graham et al. 2011).

#### Genetisch induzierter insulinabhängiger Dm

Die Akita Maus wurde erstmals in Akita (Japan) beschrieben und stammt von C57BL/6NSlc Mäusen ab. Sie trägt eine spontane Mutation im Insulin 2 Gen, die zu einer fehlerhaften Faltung des Proinsulins in den Zellen führt. Die fehlgefalteten Proteine häufen sich in den Zellen an und verursachen Zellstress im endoplasmatischen Retikulum.

Die Mäuse zeigen klinisch manifesten Dm mit 3–4 Wochen und entwickeln Hyperglykämie, Hypoinsulinämie, Polyurie und Polydipsie (Alpers und Hudkins 2011, King 2012).

### Viral induzierter Dm

Bei einigen Nagermodellen wurden verschiedene Viren (Coxsackie-B-Virus, Enzephalomyokarditis-Virus, Kilham-Rattenvirus) verwendet, um die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen auszulösen. Dabei werden die Zellen durch direkte Infektion oder durch die Auslösung eines Autoimmunprozesses gegen die Zellen zerstört.

Zudem gibt es Modelle, die auf viralem Antigen basieren. Diese Mäuse exprimieren ein virales Antigen (z.B. Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus Glykoprotein (LCMV-GP)) unter der Kontrolle des Ratten-Insulin-Promotors (RIP) und zeigen zunächst keine Anzeichen für eine  $\beta$ -Zellzerstörung. Werden die Mäuse jedoch mit dem LCMV-Virus infiziert kommt es bei der Immunantwort zu einer Kreuzreaktion mit den Antigen exprimierenden  $\beta$ -Zellen und zu deren Zerstörung (King 2012).

Ein Beispiel für dieses Modell ist die P14/RIP-GP-Maus. Diese Mäuse exprimieren neben dem viralen Antigen zusätzlich LCMV-GP spezifische  $CD8^+$  T-Zellen. Bei Infektion der Maus mit dem LCMV-Virus greifen die spezifischen T-Zellen neben den infizierten Zellen auch die  $\beta$ -Zellen des Pankreas an (Van Belle et al. 2009).

## **2.6.1.2 Nagermodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus Typ 2**

### Fütterungsinduzierter Dm

Adipositas ist beim Menschen ein großer Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2. Ähnlich wie der Mensch zeigen auch einige Mäusestämme (DIO-Mäuse, diet-induced obesity) Fettsucht, Insulinresistenz und verminderte Toleranz gegenüber Glukose, wenn sie eine sog. „Western-Diät“ erhalten (Yeadon 2015). Diese Diät enthält einen sehr hohen Fettanteil (58% der Energie werden über Fett zugeführt (King 2012)).

Der Mäuse-Inzuchtstamm C57BL/6 ist der am häufigsten verwendete Stamm für fütterungsinduzierten Dm. Hier entwickeln v.a. die männlichen Tiere schwere

Adipositas, Insulinresistenz und erhöhte Glukoseintoleranz, nicht jedoch eine basale Hyperglykämie. Daher ist dieses Modell eher für die Erforschung des Prädiabetes und des metabolischen Syndroms geeignet, als für Studien des klinisch manifesten Diabetes mellitus Typ 2 (King 2012, Yeadon 2015).

Ein weiterer anfälliger Stamm ist der NON/ShiLtJ (non-obese non-diabetic/Shionogi) Stamm. Die männlichen Tiere dieser Linie entwickeln klinisch manifesten Dm und hohe Serumspiegel der Triglyzeride, der freien Fettsäuren und von Insulin, wenn sie mit der fettreichen Diät gefüttert werden. Die erhöhten Blutglukosespiegel sinken jedoch im Alter von 4–5 Monaten wieder ab (Yeadon 2015).

### Spontane monogenetische Modelle für vererbte Fettleibigkeit und Entwicklung eines Dm Typ 2

Das Hormon Leptin ist für die Regulierung des Appetits zuständig und löst bei ausreichender Nahrungsaufnahme ein Sättigungsgefühl aus. Bei Mäusen führen Mutationen im Leptingen bzw. im Leptinrezeptorgen zu unregulierter Futteraufnahme, zur Entwicklung von Adipositas und zu klinisch manifestem Dm Typ 2.

*Ob/ob* (obese) Mäuse zeigen eine spontane Mutation im Leptingen (*Lep<sup>ob/ob</sup>*), ebenso wie die ZDF (Zucker diabetic fatty) Ratten, wohingegen *db/db* (diabetic) Mäuse eine Mutation im Leptinrezeptorgen (*Lep<sup>db/db</sup>*) tragen.

Der Schweregrad und die Ausprägung des Dm hängt dabei stark vom genetischen Hintergrund der Mäuse ab. Mäuse aus dem C57BL/6 Stamm entwickeln lediglich eine  $\beta$ -Zellhypertrophie mit Hyperinsulinämie und transienter Hyperglykämie, wohingegen Tiere aus dem C57BLKS/J Stamm schwere bis tödliche Verläufe zeigen. Hier atrophieren die  $\beta$ -Zellen des Pankreas und die Tiere leiden an Hypoinsulinämie und chronischer Hyperglykämie (Chatzigeorgiou et al. 2009, King 2012, Yeadon 2015).

## Spontane polygenetische Modelle für vererbte Fettleibigkeit und Entwicklung eines Dm Typ 2

Diabetische Nagermodelle mit polygenetischem Hintergrund spiegeln die Bedingungen für die Entwicklung eines Typ 2 Dm beim Menschen sehr viel eher wider, als monogenetische Modelle, da auch beim Menschen viele Gene für die Krankheitsanfälligkeit mitverantwortlich sind.

Unter den Rattenmodellen zählt die Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) Ratte zu den polygenetischen Diabetesmodellen.

Zu den Mausmodellen gehören die Kuo Kondo (KK) Maus, die New Zealand obese (NZO) Maus, die Nagoya Shibata Yasuda (NSY) Maus, die NONcNZO10/LtJ Maus (NZO Mäuse x NON Mäuse) und die TallyHo/JngJ Maus (ein selektiver Inzuchtstamm von Theiler original Mäusen) (Chatzigeorgiou et al. 2009, King 2012, Yeadon 2015).

Die KK Maus zeichnet sich durch Hyperphagie, milde Adipositas, hochgradige Hyperinsulinämie mit Hypertrophie der Pankreasinseln und Insulinresistenz in der Muskulatur und im Fettgewebe aus. Sie stammt von einem Wildstamm der ddY Maus aus Japan ab und wurde auf große Körpergröße selektiert.

Ein genetisch modifizierter Abkömmling der KK Maus ist die KK-A<sup>y</sup> Maus, die eine dominante Mutation im „agouti yellow“ (A<sup>y</sup>) Gen trägt. Das A<sup>y</sup> Gen wird normalerweise im Haarfollikel exprimiert und ist an der Regulierung der Pigmentierung beteiligt. Die Mutation im A<sup>y</sup> Gen führt zur Ausprägung einer gelblichen Fellfarbe und ektopischer Expression des Genprodukts im Hypothalamus, was die Regulierung des Körpergewichts beeinflusst (Voisey und Van Daal 2002, King 2012, Kong et al. 2013). Bei homozygoter Ausprägung sterben die Mäuse, heterozygot entwickeln sie Adipositas, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie. Der

Krankheitsverlauf fällt dabei schwerer aus, als bei KK Mäusen (Chatzigeorgiou et al. 2009).

NZO Mäuse sind ein Modell für polygenetische Fettsucht, deren Insulin- und Glukosespiegel denen der KK Mäuse gleichen. Zusätzlich zeigen NZO Mäuse eine hepatische Insulinresistenz und eine Leptinresistenz mit Hyperleptinämie (Chatzigeorgiou et al. 2009, King 2012).

Die NSY Maus stammt ebenso wie die NOD Maus vom Jc1:ICR Stamm ab und wurde auf Glukoseintoleranz selektiert. Hauptsächlich männliche Tiere entwickeln Dm und der Schweregrad der Erkrankung korreliert stark mit dem Alter der Tiere. Die Mäuse zeigen nur eine geringgradige Ausprägung von Adipositas, gestörter Insulinsekretion und Insulinresistenz. Bei Fütterung einer sog. Western Diät kann die Entwicklung des Dm beschleunigt werden (Chatzigeorgiou et al. 2009).

NONcNZO10/LtJ Mäuse wurden durch die Kreuzung zweier NZO Stämme mit NON Mäusen kreiert. V.a. die männlichen Tiere zeigen Insulinresistenz in Muskulatur und Leber und entwickeln chronische Hyperglykämie, jedoch nur die Hälfte der Tiere leiden nach sechs Monaten unter klinisch manifestem Dm. Des Weiteren können erhöhte Leptin- und Triglyzeridspiegel gemessen werden (King 2012, Yeadon 2015).

Die TallyHo/JngJ Maus stammt von Theiler original Mäusen ab, die Polyurie und Glukosurie zeigten. Durch Selektion auf Hyperglykämie entstand ein weiteres polygenetisches Modell für Fettsucht und Diabetes. Im Unterschied zu NONcNZO10/LtJ Mäusen zeigen beide Geschlechter der TallyHo/JngJ Maus moderate Fettsucht mit erhöhten Triglyzerid-, Cholesterol- und freien Fettsäurespiegeln, jedoch nur die männlichen Individuen entwickeln Hyperglykämie (King 2012, Yeadon 2015).

### Nagermodelle für Dm Typ 2, die keine Fettsucht zeigen

Neben den zahlreichen Nagermodellen, bei denen die Entwicklung des Dm mit der Ausprägung einer Fettsucht zusammenhängt, gibt es Modelle, die aufgrund inadäquater  $\beta$ -Zellfunktion, und nicht wegen einer zugrunde liegenden Adipositas, einen Typ 2 Dm zeigen. Auch beim Menschen kommt es in seltenen Fällen zur Entwicklung eines Dm Typ 2 ohne Anzeichen von Übergewicht. Daher ist es von großer Bedeutung, auch diese Form der Erkrankung auf Grundlage geeigneter Tiermodelle zu erforschen.

Die gängigsten Modelle auf diesem Gebiet sind die Goto-Kakizaki (GK) Ratte (mit Glukoseintoleranz und gestörter Insulinsekretion) und die *hIAPP* (humanes Inselamyloid Polypeptid) Maus (King 2012).

Die *hIAPP* Maus stellt ein transgenes Modell dar, das das Gen für humanes Inselamyloid Polypeptid exprimiert. HIAPP hat amyloidogene Eigenschaften, was zu einer extrazellulären Anreicherung von Amyloid in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas führt und folglich zu einer fortschreitenden Zerstörung der  $\beta$ -Zellen mit Entwicklung eines Dm Typ 2. Da bei vielen Typ 2 Diabetikern Amyloidablagerungen in den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse nachgewiesen werden können, scheint dieser Pathomechanismus neben der Insulinresistenz eine wichtige Rolle für die Ausprägung des Dm zu spielen. Diabetische Mäuse zeigen normalerweise keine Amyloidakkumulation in den Langerhans'schen Inseln, was einen erheblichen Unterschied zu der humanen Inselzellpathologie darstellt. Daher ist die *hIAPP* Maus ein wichtiges Modell, um die pathologischen Mechanismen beim Menschen näher zu untersuchen (Cefalu 2006, King 2012).

## 2.6.2 Nagermodelle für die Erforschung diabetischer Folgeerkrankungen

### Nagermodelle der diabetischen Makroangiopathie

Ein großer Nachteil von Nagern in Bezug auf die diabetische Makroangiopathie stellt die relativ große Resistenz gegenüber der Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen dar. Dies ist bedingt durch die Unterschiede im Lipoproteinmetabolismus. Ein weiterer Nachteil sind die geringen Gefäßdurchmesser bei Ratten und Mäusen, die zu unterschiedlichen, auf das Endothel einwirkenden, hämodynamischen Kräften im Vergleich zum Menschen führen. Daher sind atherosklerotische Veränderungen oftmals nicht an den für Menschen typischen Stellen zu finden (Heinonen et al. 2015).

Wegen der oben genannten Nachteile finden die meisten Studien an Mäusen statt, die aufgrund ihres genetischen Hintergrundes eine Dyslipidämie zeigen.

Zu diesen zählen die *ApoE*<sup>-/-</sup> (Apolipoprotein E Knockout) Maus und die *Ldlr*<sup>-/-</sup> (low density lipoprotein-receptor Knockout) Maus.

*ApoE*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine verzögerte Lipoproteine-Clearance und entwickeln stark erhöhte Serum-Cholesterinspiegel, die mit dem Auftreten atherosklerotischer Läsionen assoziiert sind.

*Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse hingegen exprimieren einen defekten LDL-Rezeptor. Füttert man diesen Tieren eine cholesterinreiche Diät, entwickeln sie atherosklerotische Gefäßalterationen.

Ein Nachteil der oben genannten Modelle sind die großen Unterschiede des Lipoproteinprofils im Vergleich zu dem des Menschen.

Um das Lipoproteinprofil der Mäuse dem des Menschen anzunähern, wurden einige *Ldlpr*<sup>-/-</sup> Mäuse weiter genetisch modifiziert. *Ldlr*<sup>-/-</sup>*ApoB*<sup>100/100</sup> Mäuse beispielweise synthetisieren ausschließlich das Apolipoprotein B 100. Werden diese Mäuse mit *ApoE*<sup>3</sup>-Leiden Mäusen, die das humane Cholesterinester Transferprotein



produzieren, gekreuzt, ist das Lipoproteinprofil dieser Tiere dem des Menschen sehr ähnlich (Heinonen et al. 2015).

Eine Diabetesinduktion mit STZ bei den oben genannten Mäusen führt neben der Entwicklung atherosklerotischer Alterationen zu einer hyperglykämischen Stoffwechsellaage bei den Tieren und ermöglicht somit Studien der diabetischen Makroangiopathie.

Außerdem werden Akita Mäuse, *ob/ob* Mäuse und *db/db* Mäuse mit  $ApoE^{-/-}$  oder  $LDLR^{-/-}$  genetischem Hintergrund verwendet. Nachteil der letzten beiden Modelle ist der hohe Anstieg der Plasmalipide, was beim Menschen nicht in dieser Ausprägung vorkommt.

Um den Anstieg der Plasmalipide zu umgehen, wurden Knockout bzw. heterozygote Mäuse für das Insulin 2 Rezeptorsubstrat kreiert, beide mit  $ApoE^{-/-}$  genetischem Hintergrund ( $Irs2^{-/-} ApoE^{-/-}$ ,  $Irs2^{+/-} ApoE^{-/-}$ ). Diese Mäuse zeigen Glukoseintoleranz, Hyperinsulinämie und entwickeln atherosklerotische Läsionen in der Aorta.

Das menschenähnlichste Lipoproteinprofil zeigen  $Ldlr^{-/-} ApoB^{100/100}$  Mäuse, die den Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) überexprimieren (Heinonen et al. 2015).

Rattenmodelle finden in Studien über kardiovaskuläre Komplikationen bei Dm kaum Verwendung, da diese Tiere eine große Resistenz gegenüber der Entwicklung einer diabetischen Makroangiopathie zeigen.

### Nagermodelle der diabetischen Neuropathie

Viele Nagermodelle, die einen klinisch manifesten Dm zeigen, entwickeln nicht die gleichen diabetischen Folgeerkrankungen, wie sie beim Menschen typisch sind (Islam 2013). Daher können nur einzelne diabetische Modelle für Studien der diabetischen Neuropathie verwendet werden.

Zu den Rattenmodellen, die Anzeichen einer diabetischen Neuropathie zeigen (wie z.B. Demyelinisierung und axonale Degeneration, verringerte motorische Nervenleitgeschwindigkeit, verminderte intraepidermale Nervenfaserdichte, Anzeichen neuropathischer Schmerzen), zählen unter anderem STZ induzierte Diabetesmodelle, die WBN/Kob (Wistar Bonn/Kobori) Ratte (ein Modell für chronische Pankreatitis mit spontanem Dm), die ZDF-Ratte, die BBZDR/Wor (biobreeding Zucker diabetes-resistant) Ratte (ein Modell für Typ 2 Dm mit Lepr-Mutation), OLETF Ratten und LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) Ratten. Zudem gibt es ein Rattenmodell, bei dem die diabetische Neuropathie über eine L-Fruktose (ein kompetitiver Inhibitor des Natrium abhängigen Myoinositol Transports) reiche Diät induziert wird (Islam 2013, Gao und Zheng 2014).

Diabetesinduktion mit STZ führt auch bei Mausmodellen zur Entwicklung neuropathischer Symptome. Die Ausprägung hängt jedoch von der Dosierung und der Anwendungsdauer und vom genetischen Hintergrund der Mäuse ab. Bei hohen einmaligen STZ Dosen zeigen die Mäuse frühzeitig einen verlässlichen neuropathischen Phänotyp, wohingegen geringdosierte Dosen über mehrere Tage nur milde Ausprägungen bis keine Anzeichen für eine diabetische Neuropathie nach sich ziehen. C57BL/6 Mäuse beispielsweise zeigen kaum neuropathische Symptome, bei Kreuzung mit 129S7 oder 129/Sv Mäusen entwickeln sie jedoch signifikante Defizite in der Nervenleitgeschwindigkeit (O'Brien et al. 2014).

Akita Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund zeigen im Krankheitsverlauf verminderte Nervenleitgeschwindigkeit, außerdem gelten sie als Modell für die autonome Neuropathie mit geschwollenen Axonen und Dendriten in den prävertebralen mesenterialen Ganglien. (Islam 2013, O'Brien et al. 2014).

Auch die NOD Maus wurde für Studien der autonomen Neuropathie verwendet, außerdem konnte das Auftreten von Hyperalgesie nachgewiesen werden (Islam 2013, O'Brien et al. 2014).

Ein Modell für die periphere diabetische Polyneuropathie stellen *db/db* Mäuse mit C57BLKS/J Hintergrund dar. Diese Tiere entwickeln zunächst Hyperalgesie und Allodynie, später dann Hypoalgesie und Defizite in der Nervenleitgeschwindigkeit motorischer und sensorischer Nerven.

Auch *ob/ob* Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund sind ein gutes Modell der peripheren Polyneuropathie, da sie zuverlässige Symptome wie Hypoalgesie zeigen (O'Brien et al. 2014).

Um pathologische Vorgänge im prädiabetischen Stadium zu untersuchen, werden DIO Mäuse, die mit einer Western Diät gefüttert werden, verwendet. Vorteile dieser Tiere sind, dass sie ernährungsbedingte und genetische Schlüsselfaktoren des humanen Dm widerspiegeln. Zudem wird bei diesen Mäusen auch erforscht, inwieweit der Fettgehalt der Nahrung und die Art der enthaltenen Fette neuropathische Vorgänge beeinflussen (O'Brien et al. 2014).

Zuletzt sind die polygenetischen Modelle (NONcNZO10/LtJ Maus und TallyHo/JngJ Maus) zu erwähnen. Sie stellen ein interessantes Modell dar, müssen zukünftig aber noch in Bezug auf die Entwicklung neurologischer Komplikationen bewertet werden (O'Brien et al. 2014).

#### Nagermodelle der diabetischen Nephropathie

Ratten- und Mausmodelle zur Erforschung der diabetischen Nephropathie unterliegen den gleichen Limitationen wie die Modelle für die oben genannten Folgeerkrankungen des Dm. Kein Nagermodell spiegelt alle wichtigen funktionellen, strukturellen und molekularen pathologischen Vorgänge einer fortgeschrittenen

humanen diabetischen Nephropathie wider. Um geeignete Tiermodelle zu etablieren, veröffentlichte eine Unterkommission des *Diabetic Complications Consortium* (DiaComb) Kriterien für ein ideales Nagermodell der diabetischen Nephropathie:

- Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (und somit der Nierenfunktion) um mehr als 50% über die gesamte Lebensspanne des Tieres
- Zehnfacher Anstieg der Albuminurie
- Ausprägung pathologischer Schlüsselmerkmale der humanen diabetischen Nephropathie (mesangiale Matrixexpansion, Zunahme der glomerulären Basalmembrandicke, Hyalinose der Arteriolen, tubulointerstitielle Fibrose).

Anhand dieser Kriterien können neue Modelle validiert werden (Alpers und Hudkins 2011, Kong et al. 2013, Betz und Conway 2016).

Mausmodelle sind bei Studien der diabetischen Nephropathie am weitesten verbreitet. Daneben werden auch einige Rattenmodelle verwendet, darunter GK Ratten, OLETF Ratten, ZDF Ratten und diabetische *Cyp1a1mRen2* (Cytochrome P450 1a1 murine renin) Ratten (die Tiere exprimieren murine cDNA für Renin unter der Kontrolle des Cyp1a1 Promotors).

Je nach genetischem Hintergrund sind die Mäuse unterschiedlich anfällig für die Entwicklung Dm-assoziierter renaler Alterationen. C57BL/6 Mäuse sind relativ resistent, wohingegen FVB (Friend virus B) und DBA/2J (dilute brown non-agouti) Mäuse empfänglicher sind (Alpers und Hudkins 2011, Betz und Conway 2016).

Auch Forschungsergebnisse aus dem Institut für Tierpathologie der LMU München über *GIPR<sup>dn</sup>* transgene Mäuse belegen, dass die Entwicklung Dm-assoziierter Nierenalterationen vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängt.

*GIPR<sup>dn</sup>* transgene Mäuse exprimieren einen dominant-negativen glukoseabhängigen insulinotropen Polypeptidrezeptor unter der Kontrolle des Ratten Proinsulin 2 Promotors. Das glukoseabhängige insulinotrope Polypeptid 1 wird von endokrinen

Darmzellen sezerniert und ist mitverantwortlich für den sog. Inkretineffekt: bei oraler Glukoseaufnahme ist die resultierende Insulinausschüttung höher als bei intravenöser Infusion der gleichen Menge Glukose. Es wird angenommen, dass die Beeinträchtigung des Inkretineffekts zur Entwicklung des Dm Typ 2 beim Menschen beiträgt (Wolf et al. 2014). *GIPR<sup>dn</sup>* transgene Mäuse mit C57BL/6 bzw. BALB/c genetischem Hintergrund entwickeln trotz diabetischer Stoffwechsellage keine Dm-assoziierten Nierenalterationen. Im Gegensatz dazu zeigen *GIPR<sup>dn</sup>* Mäuse mit CD1 bzw. FVB/N genetischem Hintergrund Dm-assoziierte renale Veränderungen (Popper 2013, Seibold 2015).

Ein weiteres Beispiel ist die *db/db* Maus, die v.a. für Studien über renale Alterationen infolge eines Typ 2 Dm verwendet wird. Für die Entwicklung von Nierenkomplikationen ist auch hier der genetische Hintergrund von großer Bedeutung. C57BLKS/J Mäuse zeigen Nierenveränderungen, die den Frühstadien beim Menschen entsprechen (Albuminurie, Podozytenverlust, mesangiale Matrixexpansion), entwickeln jedoch keine fortschreitende Niereninsuffizienz. Bei Mäusen mit C57BL/6 Hintergrund hingegen konnten keine Anzeichen für das Auftreten Dm-assoziiierter Nierenalterationen nachgewiesen werden (Alpers und Hudkins 2011, Kong et al. 2013).

*Ob/ob* Mäuse entwickeln pathologische Merkmale frühstadialer und fortgeschrittener Dm-assoziiierter Nierenalterationen in relativ kurzer Zeit, wenn ihr genetischer Hintergrund der insulinresistente BTBR (black and tan, brachyuric) Mäusestamm ist. Nachteil dieser Mäuse ist die hohe Mortalität und die Unfruchtbarkeit der Tiere (Alpers und Hudkins 2011, Kong et al. 2013, Betz und Conway 2016).

Die OVE26 (overexpressing) Maus ist ein genetisch modifiziertes Mausmodell mit Typ 1 Dm. Sie trägt eine Mutation im Calmodulingen, die unter Kontrolle eines Insulingenpromotors steht. Die Anhäufung des Genprodukts in den  $\beta$ -Zellen des

Pankreas führt zu deren Untergang. OVE26 Mäuse mit FVB Hintergrund zeigen schwere Albuminurie, Hypertension und strukturelle Nierenveränderungen, wie sie bei fortgeschrittener diabetischer Nephropathie typisch sind (noduläre Glomerulosklerose, Matrixexpansion, GBM-Verbreiterung, tubulointerstitielle Fibrose). Limitierend bei diesem Modell ist die starke Abhängigkeit der diabetischen Nephropathie vom genetischen Hintergrund der Mäuse (Alpers und Hudkins 2011, Kong et al. 2013, Betz und Conway 2016).

Die Akita Maus ist ein weiteres Mausmodell zur Erforschung des Dm Typ 1. Akita Mäuse mit C57BL/6 und 129/SvEv genetischem Hintergrund entwickeln neben klinisch manifestem Dm moderate Albuminurie und geringgradige strukturelle Nierenveränderungen wie glomeruläre mesangiale Matrixexpansion und Verdickung der glomerulären Basalmembran. DBA/2 Stämme mit Insulin 2 Genmutation zeigen vermehrt Albuminurie, noduläre Glomerulosklerose und Hyalinose der Arteriolen, jedoch keine mesangiale Matrixexpansion (Alpers und Hudkins 2011, Betz und Conway 2016).

Akita Mäuse mit einem homozygoten Defekt im Bradykinin-2 Rezeptorgen entwickeln eine vierfach erhöhte Albuminurie und hochgradige mesangiale Matrixexpansion. Liegt zusätzlich ein Defekt im Bradykinin-1 Rezeptorgen vor, verschlimmern sich die Befunde der Dm-assozierten Nierenalterationen. Die Bradykininrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Der Bradykinin-1 Rezeptor (BR-1) wird bei Gewebeschädigung und Entzündungen induziert und vermehrt exprimiert, wohingegen der BR-2 ubiquitär im Körper exprimiert wird (Golias et al. 2007).

Die Downregulation des BR-2 führt zur vermehrten Freisetzung zahlreicher Zytokine (z.B. TGF  $\beta$ 1 und connective tissue growth factor) in der Niere, die zur Entwicklung einer Glomerulosklerose beitragen (Brosius et al. 2009).

Ein polygenetisches Mausmodell für frühstadiale Nierenveränderungen ist die KK/A<sup>y</sup> Maus. Sie zeigt Albuminurie, glomeruläre Hypertrophie und geringgradige glomeruläre mesangiale Matrixexpansion. Ein großer Nachteil dieses Modells ist die hohe Sterblichkeit aufgrund einer obstruktiven Uropathie (Kong et al. 2013).

Ein weiteres polygenetisches Modell stellt die NONcNZO10/LtJ Maus dar. Dieser Stamm entwickelt bei sehr fetthaltigen Diäten progressiv ansteigende Albuminurie und Glomerulosklerose, zeigt aber zusätzlich atypische Veränderungen wie Thromben in den Glomerulumkapillaren und mesangiale glomeruläre Fettablagerungen (Brosius et al. 2009).

Die *eNos*<sup>-/-</sup> (endothelial nitric oxide synthase) knockout Maus ist ein genetisch manipuliertes Modell, das sehr früh Dm-assozierte Alterationen entwickelt. Stickstoffmonoxid ist ein wichtiger Regulator des Gefäßtonus. Verminderte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid führt zu endothelialer Dysfunktion und Bluthochdruck, beides Faktoren, die die Entwicklung der diabetischen Nephropathie begünstigen und beschleunigen. Wird die *eNos*<sup>-/-</sup> Maus mit C57BL/6 Hintergrund mit einer *db/db* Maus mit C57BLKS/J Hintergrund gekreuzt, resultieren daraus Mäuse, die eine fortgeschrittene diabetische Nephropathie ausprägen (Albuminurie, glomeruläre, mesangiale Matrixexpansion mit Mesangiolyse, noduläre Glomerulosklerose, arterioläre Hyalinose). Eine andere Möglichkeit der Diabetesinduktion bei *eNos*<sup>-/-</sup> Mäusen besteht in der Applikation von STZ (Brosius et al. 2009, Alpers und Hudkins 2011, Kong et al. 2013, Betz und Conway 2016).

Auch *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäuse, bei denen der Dm mittels STZ ausgelöst wurde, zeigen höhergradige Alterationen der Nieren als STZ induzierte Wildtypen. Dies beruht auf der Hyperlipidämie und der Anreicherung von AGEs in der Niere (Betz und Conway 2016).

*TTRhREN* Mäuse, die mit OVE26 Mäusen rückgekreuzt wurden, sind ein weiteres Modell, bei dem es aufgrund der Hypertension beschleunigt zur Entwicklung der diabetischen Nephropathie kommt. *TTRhREN* Mäuse exprimieren humane Prorenin cDNA in der Leber, was zu reninabhängigem Bluthochdruck führt. Die Tiere zeigen signifikante Albuminurie, mesangiale Matrixexpansion, tubulointerstitielle Fibrose und verminderte Nierenfunktion (Betz und Conway 2016).

C57BL/6 Mäuse, die einen Defekt im Decorinogen tragen, sind ein Modell fortgeschrittener diabetischer Nephropathie. Decorin, ein Proteoglykan, kommt v.a. in der extrazellulären Matrix vor und übernimmt dort viele Funktionen durch die Bindung an Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , EGF (epidermal growth factor). In geschädigten Nieren wird es überexprimiert, was Rückschlüsse auf eine protektive Funktion für die Niere zulässt.

Decorin-Null Mäuse zeigen höhergradige Matrixexpansion und eine gesteigerte Abnahme der Nierenfunktion im Vergleich zu Wildtypen (Brosius et al. 2009).

Podozyten spezifische Insulinrezeptor Knockout Mäuse tragen einen Podozyten-spezifischen Defekt im Insulinrezeptorgen, der unter Kontrolle des Podocin- und Nephrinpromotors steht. Der genetische Hintergrund der Mäuse setzt sich aus einer Mischung aus mehreren Stämmen zusammen (C57BL/6, 129/Sv, FVB).

Diese Mäuse entwickeln Merkmale der diabetischen Nephropathie (vermehrte Apoptose der Podozyten, Verschmelzung der Fußfortsätze, mesangiale Matrixexpansion und Proteinurie), zeigen aber normale Insulin- und Glukosespiegel.

Das Modell gilt neben GH (growth hormone) transgenen Mäusen als wertvoll für die Untersuchung podozytenspezifischer Vorgänge, die zur Entwicklung der diabetischen Nephropathie beitragen (Wanke et al. 2001, Alpers und Hudkins 2011).

Eine Diabetesinduktion mit STZ bei Mäusen findet aufgrund der nephrotoxischen Eigenschaften der Substanz und nach Empfehlung des *Diabetic Complications*



*Consortium* nur im niedrig dosierten Bereich Verwendung für Studien der diabetischen Nierenkomplikationen. Abhängig vom genetischen Hintergrund entwickeln die Mäuse moderate Proteinurie, einen Anstieg des Serumkreatinins und eine geringgradige glomeruläre Matrixexpansion (Kong et al. 2013, Betz und Conway 2016).

### **2.6.3 Großtiermodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus**

Zu den Spezies, die in der Diabetesforschung genutzt werden, zählen Kaninchen, Katzen, Hunde, Affen und Schweine (Cefalu 2006, Chatzigeorgiou et al. 2009, King 2012).

Die Diabetesinduktion erfolgt bei Großtieren aus Mangel einer spontanen Diabetesentwicklung (mit Ausnahme der Katze und einigen Affenarten) zumeist durch experimentelle Modifikationen. Die Applikation von STZ oder Alloxan ist hierbei die gängigste Methode, doch auch die komplette oder partielle chirurgische Entfernung der Bauchspeicheldrüse wird praktiziert.

Bei Kaninchen und Schweinen werden auch genetisch modifizierte Tiere (u.a. *INS*<sup>C94Y</sup> und *GIPR*<sup>dn</sup> transgene Schweine, siehe 2.6.3.1) verwendet (Renner et al. 2010, King 2012, Renner et al. 2013, Wolf et al. 2014).

Kaninchen finden v.a. in Studien der diabetischen Makroangiopathie Verwendung. Hierfür werden unter anderem genetisch manipulierte Tiere mit einem Gendefekt im Low-Density Lipoproteinrezeptor genutzt (Heinonen et al. 2015).

Feline Tiermodelle sind gute Modelle für die Erforschung des Diabetes mellitus.

Hauskatzen leben unter den gleichen Bedingungen wie Menschen und sind somit den gleichen Risikofaktoren (Bewegungsmangel, Adipositas) wie der Mensch ausgesetzt. Klinisch manifest wird der Diabetes mellitus Typ 2 zumeist im mittleren Alter der Katzen (mit 9 bis 13 Jahren). Das höhere Alter ist somit ähnlich wie beim

Menschen auch bei Katzen ein begünstigender Faktor für die Entwicklung eines Dm Typ 2.

Ein weiterer Vorteil von Katzenmodellen ist die Entwicklung diabetischer Komplikationen (diabetische Retinopathie und Neuropathie) und die Ausprägung gleicher histopathologischer Befunde der Langerhans'schen Inseln des Pankreas (Amyloidablagerungen), wie beim Menschen (Cefalu 2006, Chatzigeorgiou et al. 2009). Diese Tatsache macht die Katze als Modell für die Erforschung des Typ 2 Dm interessant.

Hunde finden aufgrund ethischer Bedenken eher selten Verwendung in der Diabetesforschung, dennoch gibt es Studien an pankreatektomierten Hunden (King 2012).

Affen werden wegen der generellen großen Ähnlichkeit zum Menschen in der Dm-Forschung verwendet.

Einige Affenarten wie die Rhesusaffen, Bonnetaffen, Formosa Makaken, Pig-tailed Makaken, Celebes Makaken, grünen Meerkatzen und Paviane entwickeln mit zunehmendem Alter einen spontanen Dm Typ 2 mit Amyloidablagerungen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas, wenn sie Risikofaktoren wie Adipositas ausgesetzt sind (Cefalu 2006).

Zudem gibt es Studien an Affen, in denen der Dm mittels STZ Applikation oder Pankreatektomie ausgelöst wurde (King 2012).

Trotz vieler Vorteile der Großtiermodelle im Vergleich zu Nagern (wie z.B. die größere Ähnlichkeit pathologischer Mechanismen zu denen beim Menschen, das Vorfinden größerer Gefäßstrukturen mit der Möglichkeit, chirurgische Maßnahmen durchzuführen etc.) unterliegen diese Modelle auch vielen Limitationen. Die Haltung der Tiere ist kostenintensiv und bedarf viel Platz. Die Reproduktionsintervalle sind lang und oftmals saisonal begrenzt. Das Genom ist nicht oder nur teilweise

entschlüsselt, was genetische Manipulationen erschwert. Außerdem wird die Verwendung von Primaten und „Haustieren“ in Tierversuchen in der Gesellschaft als ethisch kompliziert angesehen.

### **2.6.3.1 Schweinemodelle für die Erforschung des Diabetes mellitus**

Schweinemodelle haben gegenüber anderen Großtiermodellen zahlreiche Vorteile. Frühe Geschlechtsreife, relativ kurze Reproduktionsintervalle, viele Jungtiere pro Wurf und die Möglichkeit gezielte genetische Manipulationen durchzuführen, machen diese Tiere attraktiv für wissenschaftliche Studien (Wolf et al. 2014). Des Weiteren ist die kommerzielle Haltung von Schweinen seit langem etabliert und deshalb weitaus kostengünstiger als die Haltung anderer Großtiere wie beispielsweise die von Primaten (Aigner et al. 2010).

Schweine spiegeln zudem in vielerlei Hinsicht die Physiologie und Pathophysiologie des Menschen wider. Wie der Mensch sind Schweine omnivor und besitzen einen ähnlich aufgebauten Magen-Darm-Trakt. Die Morphologie des Pankreas, die Anatomie und Funktion des kardiovaskulären Systems und der metabolische Status sind in vielen Aspekten gleich wie beim Menschen. Schweine zeigen ein Lipoproteinprofil, das im Gegensatz zu den Nagermodellen ohne genetische Manipulation dem des Menschen gleicht und neigen zu Adipositas. Die Pharmakokinetik subkutan applizierter Medikamente ähnelt der humanen Pharmakokinetik, was Studien über neue Medikamente vereinfacht. Außerdem sind Schweine, was Körpergröße und –gewicht angeht, gute Modelle um standardisierte diagnostische und chirurgische Techniken für die Humanmedizin zu entwickeln (Bellinger et al. 2006, Cefalu 2006, Chatzigeorgiou et al. 2009, Torres-Rovira et al. 2012, Wolf et al. 2014).

Verschiedene Schweinerassen werden in der Diabetesforschung verwendet.

Zumeist handelt es sich hierbei um Minischweine, die aufgrund ihres geringeren Körpergewichts einfacher und kostengünstiger zu halten sind und ein geringeres Gefahrenpotential für den Menschen darstellen.

### Yucatan Minischwein

Die Yucatan Minischweine stammen von der mexikanischen Halbinsel Yucatan und werden seit 1996 als Tiermodell genutzt.

Durch selektive Züchtung wurden zwei Stämme etabliert. Der „Low K“ Stamm zeichnet sich durch beeinträchtigte Glukosetoleranz aus, der „High K“ Stamm durch gesteigerte Toleranz. Die beeinträchtigte Glukosetoleranz des „Low K“ Stammes wird durch niedrige Plasmainsulinspiegel bedingt, von denen angenommen wird, dass sie nicht durch eine gestörte Insulinsynthese ausgelöst werden, sondern durch einen modifizierten Pankreasrezeptor, bzw. eine beeinträchtigte, dem Rezeptor nachgeschaltete Signaltransduktion.

Weibliche Tiere dieses Stammes werden in relativ kurzer Zeit adipös und einige entwickeln eine Insulinresistenz und DM während der Trächtigkeit und der Laktation (Bellinger et al. 2006, Cefalu 2006, Chatzigeorgiou et al. 2009).

Diäten mit hohem Fettanteil und Saccharose als Kohlenhydratquelle führen zu anhaltend hohen Plasmaglukosespiegeln und erhöhten peripheren Insulinspiegeln.

Eine Diabetesinduktion mit Alloxan löst neben Hyperglykämie auch eine Dyslipidämie aus, die sich durch erhöhte Triglyzerid- und Cholesterinwerte auszeichnet (Bellinger et al. 2006).

Das Yucatan Minischwein wird derzeit als Modell für Dyslipidämie, Atherosklerose, kindliche Adipositas und mikrovaskuläre diabetische Komplikationen (Retinopathie) verwendet (Bellinger et al. 2006, Neeb et al. 2010).

### Sinclair Minischweine

Das Sinclair Minischwein wurde aus vier Wildstämmen gezüchtet. Später wurde ein Stamm des Yorkshire Schweins in die Linie integriert.

Diabetesinduktion mit Alloxan führt bei Sinclair Minischweinen zu postprandialer Hyperglykämie und Hypoinsulinämie.

Die Sinclair Schweine werden u.a. für Studien der vaskulären Dysfunktion bzw. Atheroskleroseentwicklung verwendet. Hierfür werden die Tiere mit fettreicher atherogener Diät gefüttert. Sie zeigen ähnliche Lipoproteinprofile wie humane Diabetiker und entwickeln atherosklerotische Veränderungen in den Koronararterien (Bellinger et al. 2006).

### Göttingen Minischweine

Göttingen Minischweine wurden in den 60er Jahren in Göttingen durch Kreuzung des vietnamesischen Hormel Schweins mit dem Deutsche Landrasse Schwein gezüchtet. Nach Diabetesinduktion mit Alloxan oder STZ dienen sie der Erforschung pathophysiologischer Aspekte des Dm, sowie therapeutischer Maßnahmen.

Wird den Schweinen eine fettreiche Diät verabreicht, gelten sie als attraktives Modell des metabolischen Syndroms (Larsen et al. 2002, Bellinger et al. 2006, Ludvigsen et al. 2015).

Die Göttingen Minischweine sind auch als spezifisch pathogenfreie (SPF) Tiere verfügbar. Über die Firma Ellegaard (Dänemark) sind die Tiere kommerziell erhältlich.

### Yorkshire Schweine

Yorkshire Schweine gehören einer alte Rasse aus Yorkshire an, die sich durch einen großen Körperrahmen auszeichnet.

Diese Schweine werden v.a. für Atheroskrosetudien verwendet. Eine Diabetesinduktion erfolgt zumeist mit STZ. Die Tiere zeigen eine Reduktion der  $\beta$ -Zellen, Hyperglykämie und beeinträchtigte Glukosetoleranz. Außerdem entwickeln sie atherosklerotische Veränderungen, die bei zusätzlicher Fütterung atherogener Diäten bis hin zu Gefäßverschlüssen reichen (Gerrity et al. 2001, Bellinger et al. 2006, Van den Heuvel et al. 2012).

#### Chinesische Guizhou Minischweine

Das Guizhou Minischwein ist beispielhaft für die zahlreichen aus China stammenden Minischwein-Stämme.

Nach Fütterung einer fettreichen Diät entwickeln diese Tiere erhöhte Cholesterin- und Triglyzeridspiegel, Adipositas, Glukoseintoleranz, eine Abnahme der  $\beta$ -Zellen des Pankreas und atherosklerotische Läsionen.

Sie gelten als gutes Modell für Studien der diabetischen Makroangiopathie und für die Testung neuer Medikamente (Xi et al. 2004, Bellinger et al. 2006).

#### Ossabaw Schweine

Man nimmt an, dass Ossabaw Schweine ursprünglich von Tieren aus Spanien abstammen, die von Seefahrern in die USA mitgebracht wurden. Geflüchtete Tiere lebten seither in genetischer Isolierung auf den Ossabaw Inseln. Das hohe Futteraufkommen im Herbst und die Futterknappheit im Winter führten zu einem neuen „sparsamen“ Genotyp. Die Schweine können mit der Futterknappheit sehr gut umgehen, neigen aber im Gegenzug bei freiem Zugang zu Futter zu Adipositas und zeigen erhöhte Triglyzerid- und Cholesterinwerte im Blut.

Futterreichtum führt bei dieser Schweinerasse aufgrund der begünstigenden Risikofaktoren (Adipositas, Dyslipidämie) zur Entwicklung eines Typ 2 Dm und einer

Insulinresistenz. Vor allem die Leber scheint eine verminderte Sensitivität gegenüber Insulin auszuprägen.

Bei Fütterung einer fettreichen Diät sind sie ein gutes Modell für das metabolische Syndrom (Bellinger et al. 2006, Neeb et al. 2010).

#### Familiär hypercholesterinämische Schweine

Schweine, die eine familiär bedingte Hypercholesterinämie zeigen, wurden in Madison, Wisconsin entwickelt. Die Hypercholesterinämie wird durch eine Mutation im LDL Rezeptorgen ausgelöst und verursacht eine Dyslipidämie, wie sie auch bei Menschen mit Insulinresistenz gefunden wird (Bellinger et al. 2006).

Die Tiere werden spontan hypercholesterinämisch und erkranken an hochgradiger Atherosklerose der Koronararterien und der abdominalen Aorta. Hierzu bedarf es keiner fettreichen Diät.

#### Iberische Schweine

Das Iberische Schwein neigt aufgrund eines Polymorphismus im Leptinrezeptorgen zu vermehrter Futteraufnahme, gesteigertem Körpergewicht und Fettablagerung unter der Haut und in den Muskelfasern.

Wegen der Leptinresistenz zeigen die Tiere erhöhte Leptinspiegel, was auch beim Menschen vorkommt.

Haben die Tiere uneingeschränkten Zugang zu fettreichem Futter, entwickeln die Schweine Adipositas, Insulinresistenz, beeinträchtigte Glukosetoleranz und Bluthochdruck. Daher werden sie für Studien des Metabolischen Syndroms und des Dm Typ 2 vermehrt verwendet (Torres-Rovira et al. 2012).

### Genetisch modifizierte diabetische Schweine

Die genetische Modifikation von Schweinen dient der Erforschung genetischer und funktioneller Grundlagen spezifischer humaner Erkrankungen. So wurden beispielsweise bereits transgene Schweinemodelle der zystischen Fibrose und der Duchenne Muskeldystrophie erstellt (Klymiuk et al. 2012 b, Klymiuk et al. 2013, Klymiuk et al. 2016). Verschiedene Techniken, u.a. pronukleäre DNS-Mikroinjektion in befruchtete Eizellen, spermienvermittelter Gentransfer, lentiviraler Gentransfer und somatischer Zellkernttransfer mit der Verwendung genetisch modifizierter Donorzellen, werden für die Erstellung der Schweinemodelle verwendet (Aigner et al. 2010).

*GIPR<sup>dn</sup>* (dominant negative glucose-dependent insulinotropic polypeptid receptor) transgene Schweine.

Die Inkretinhormone GIP (glucose dependent insulinotropic polypeptid) und GLP-1 (glukagon-like peptide-1) werden von den Enterozyten des Darms sezerniert und bewirken eine verstärkte Insulinfreisetzung bei oraler Glukoseaufnahme – der sog. Inkretineffekt. Bei Patienten mit Typ 2 Dm ist die Wirkung des GIP stark vermindert und es wird vermutet, dass die beeinträchtigte GIP Wirkung an der Pathogenese des Dm Typ 2 beteiligt ist. Eine Variation im GIP Rezeptorgen könnte eine mögliche Ursache dafür sein.

*GIPR<sup>dn</sup>* transgene Schweine exprimieren neben dem intakten einen defekten, dominant negativen GIP-Rezeptor unter der Kontrolle des Ratten-Insulin 2-Promotors in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Der defekte GIPR bindet GIP mit normaler Affinität und konkurriert mit dem intakten Rezeptor um das Substrat. Normalerweise führt die Bindung von GIP an seinen Rezeptor zu einer Signaltransduktionskaskade, die mit der intrazellulären Erhöhung des cAMP-Spiegels einhergeht. Bei dem defekten GIPR



kommt es nicht zur Signaltransduktion. Dies führt zu einer starken Reduktion des insulinotropen Effekts von GIP.

Die Tiere zeigen einen gestörten Inkretineffekt und eine fortschreitende Reduktion der Insulinsekretion mit steigender Glukoseintoleranz. Die verminderte Insulinsekretion geht auf die beeinträchtigte physiologische Expansion der  $\beta$ -Zellen mit zunehmendem Wachstum und Alter der Schweine zurück.

Dieses Schweinemodell ist geeignet für Studien des Prädiabetes, sowie für die Entwicklung neuer Therapieansätze auf Grundlage der Inkretinhormone (Aigner et al. 2010, Renner et al. 2010, Wolf et al. 2014).

*HNF1A* (hepatocyte nuclear factor 1 alpha) transgene Schweine.

Eine Mutation im *HNF1A* Gen (bezeichnet als P291fsinsC) ist beim Menschen verantwortlich für eine gestörte Insulinsekretion und führt zu einem MODY 3.

Die kürzlich beschriebenen *HNF1A* transgenen Schweine tragen das dominant-negative humane *HNF1A* (P291fsinsC) Gen und exprimieren einen defekten *HNF1A*.

Die Tiere zeigen hochgradige Hyperglykämie und eine Abnahme der Anzahl pankreatischer  $\beta$ -Zellen. Zudem entwickelten alle transgenen Tiere der Studie (n = 3) von den Autoren der Arbeit als „noduläre glomeruläre Läsionen“ beschriebene Alterationen der Nieren, weswegen sie zurzeit als vielversprechendes Modell für die Erforschung der diabetischen Nephropathie diskutiert werden.

Da das defekte Genprodukt auch in den Nieren nachgewiesen wurde, muss jedoch künftig noch geklärt werden, ob die Nierenläsionen aufgrund der Hyperglykämie oder des defekten *HNF1A* entstanden sind (Hara et al. 2014, Wolf et al. 2014).

*INS*<sup>C94Y</sup> (Insulin) transgene Schweine

*INS*<sup>C94Y</sup> transgene Schweine wurden als Modell für den permanenten neonatalen Diabetes mellitus (PNDM) entwickelt (Renner et al. 2013) und sind im Folgenden näher beschrieben, da sie Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sind.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Das *Munich MIDY-Pig Biobank* Projekt (Blutke et al. 2017)

Am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU München (Prof. Dr. Eckhard Wolf) wurden zahlreiche transgene Schweinemodelle für die Diabetes mellitus-Forschung generiert und in Zusammenarbeit u.a. mit der Abteilung Molekularer und Experimenteller Pathologie (Prof. Dr. Rüdiger Wanke) am Institut für Tierpathologie der LMU München charakterisiert (Aigner et al. 2010, Renner et al. 2010, Renner et al. 2012, Klymiuk et al. 2012 a, Klymiuk et al. 2012 b, Klymiuk et al. 2013, Renner et al. 2013, Wolf et al. 2014, Wuensch et al. 2014, Abbott 2015, Kemter und Wolf 2015, Streckel et al. 2015, Klymiuk et al. 2016).

Ein transgenes porzines Modell zur Erforschung des Dm sind die zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen diabetischen Schweine.

Beim Menschen gibt es verschiedene Mutationen im Insulingen, die zur Ausprägung eines permanenten Dm führen, dem sog. „mutant insulin gene-induced diabetes of youth“ (MIDY) (Blutke et al. 2017). Eine davon führt zur Expression der Insulinmutante C96Y, die an Position 96 des Insulinmoleküls eine abweichende Aminosäure aufweist.

Ein Pendant dazu stellen die *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine dar. Sie exprimieren als Genprodukt die Insulinmutante C94Y, die der Insulinmutante C96Y des Menschen entspricht, da das porzine Insulinmolekül zwei Aminosäuren kürzer ist als das humane. Ursächlich für die Expression der Insulinmutante ist eine durch genetische Modifikation herbeigeführte Mutation im Insulingen, das an Position 340 Adenin statt Guanin trägt.

Der Aminosäureaustausch von Cystein zu Tyrosin führt im Insulinmolekül an Position 94 zu einer Störung der Disulfidbindung zwischen den Molekülketten und folglich zu einer beeinträchtigten Prozessierung des Insulins.

Das fehlgefaltete (Pro)insulin häuft sich im endoplasmatischen Retikulum an, verursacht Zellstress und letztendlich die Apoptose der  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Renner et al. 2013, Wolf et al. 2014).

Der so hervorgerufene permanente neonatale Diabetes mellitus führt bereits bei einjährigen Schweinen zu persistierender Hyperglykämie, Katarakten und einem progressiven Verlust der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas (Renner et al. 2013, Wolf et al. 2014).

Die zweijährigen *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweine stellen aufgrund des Langzeit-Dm ein wertvolles Tierkollektiv für die Diabetes mellitus-Forschung dar. Um die generierten Probenmaterialien der zweijährigen *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweine und der Kontrolltiere zu asservieren und somit die Nachfrage nach einem für ein breites Analysespektrum geeigneten, standardisierten Probenmaterial für Untersuchungen verschiedenster Disziplinen decken zu können, wurde eine Biobank (*Munich MIDY-Pig Biobank*) aus umfangreichen Gewebe- und Körperflüssigkeitenproben dieser Tiere angelegt (Blutke et al. 2014, Abbott 2015, Blutke et al. 2017).

Ein von der Firma Minitüb GmbH entwickeltes Identifikations- und Lagerungssystem ermöglicht den gezielten Zugriff auf die Proben und die assoziierten Daten, die im Laufe des Projekts generiert wurden.

Das Ziel des *Munich MIDY-Pig Biobank* Projekts besteht darin, internationalen, in der translationalen Dm-Forschung tätigen Wissenschaftlern sowohl qualitativ, als auch im Hinblick auf das Auftreten und die Ausprägung Dm-assoziiierter Alterationen eingehend charakterisierte Probenmaterialien zur Verfügung zu stellen und somit die Identifizierung von diagnostisch und prognostisch relevanten Biomarkern als Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapieansätze zu unterstützen (Blutke A et al. 2014). Zusätzlich werden die generierten Daten in „Multi-Organ-Multi-Omics“ Ansätzen dargestellt. Die Zusammenführung der gewonnenen Genom-, Proteom-,

Transkriptom- Metabolom- Lipidom- und Mikrobiom-Datensätze ermöglicht die effiziente Auswertung großer Datenmengen und eröffnet neue Möglichkeiten bei der Suche nach prognostisch relevanten Biomarkern (Blutke et al. 2017).

### **3.1.1 Versuchstiere**

Das für die Erstellung der *Munich MIDY-Pig Biobank* verwendete Tierkollektiv bestand aus vier weiblichen  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen im Alter von ca. vierundzwanzig Monaten und fünf Wildtyp-Wurfgeschwistern gleichen Alters und Geschlechts.

Zudem wurden ein ca. dreijähriger  $INS^{C94Y}$  transgener Eber sowie ein Kontrolltier (ein dreijähriger Zuchteber) nachträglich in die Biobank aufgenommen.

Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen einzeln gehalten, kontrolliert gefüttert und einer täglichen suboptimalen Insulin-Therapie unterzogen.

### **3.1.2 Sektion und Probennahme**

Alle Sektionen fanden in der Sektionshalle des Instituts für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München statt. Die 57 Mitglieder des *Munich MIDY-Pig Biobank*-Teams führten die Sektionen der neun weiblichen Tiere innerhalb eines Zeitraumes von drei Wochen durch. Die veranschlagte Zeit für jedes Tier umfasste einen halben Tag. Um einen reibungslosen Ablauf und eine schnelle Probengewinnung gewährleisten zu können, wurden die Untersuchenden bereits vorab in mehrere Sektionsteams eingeteilt. Jedes Team war für die Entnahme und die weitere Prozessierung eines Organsystems zuständig.

Nach Anlieferung der bereits unter Sedation stehenden Schweine wurden diese durch intravenöse Applikation von T61 (Intervet, Deutschland) euthanasiert.

Das weitere Vorgehen erfolgte nach Sektions-Protokollen für mehr als 40 unterschiedliche Organe und Gewebe, die im Voraus erstellt worden waren. Dabei wurden im Rahmen der Toxikopathologie etablierte Guidelines für die Probengewinnung bei Nagern (Ruehl-Fehlert et al. 2003) für das Schwein adaptiert und neue Probennahme-Leitlinien für Schweinemodelle in der translationalen Medizin entwickelt (Blutke A et al. 2014, Albl et al. 2016). Um die Generierung repräsentativer Proben zu gewährleisten, wurden systematisch zufällige Beprobungsverfahren verwendet (Howard und Reed 2005). Die gewonnenen Proben wurden unter Einhaltung einer „death-to-dry-ice-time“ (Zeit zwischen Eintritt des Todes und der Entnahme und Fixierung der Proben) von 30 Minuten aliquotiert und unter Verwendung verschiedener Fixantien (Formaldehydlösung, Methacarnfixans, Glutaraldehydlösung oder Alkohol) fixiert. Die anschließende Prozessierung der Proben erfolgte unter der Verwendung unterschiedlicher Einbettungsmedien (Paraffin, GMA/MMA oder Epon) bzw. beinhaltete die Anfertigung von gefrorenen Proben für die Gefrierschnitthistologie und die Kryokonservierung von Proben für molekularbiologische Analysen (siehe Abbildung 1).

Dabei wurden pro Schwein rund 20000 Proben von über 40 verschiedenen Organen/Geweben gewonnen. Diese umfassten ca. 12000 Proben für feingewebliche Untersuchungen (Paraffin- und Kunststoffhistologie, Gefrierhistologie, Elektronenmikroskopie und quantitativ-stereologische Analysen) und rund 8000 Proben für RNA- und Proteinanalysen, sowie mehr als 2000 Körperflüssigkeitenproben (Serum, Blut, Synovia, Liquor) (Blutke et al. 2017). Eine Zusammenfassung der gewonnenen Proben zeigt Tabelle 3.



**Abbildung 1:** Beispielhafte Darstellung der Generierung und Prozessierung von Nierenkortexproben eines  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweines. Unter Einhaltung der Protokolle für die Probennahme beim Schwein wurden Proben an systematisch zufällig ausgewählten Lokalisationen entnommen, aliquotiert und für weiterführende Analyseverfahren in verschiedene Probenbehältnisse verbracht. Bild: PD. Dr. A. Blutke, Institut für Tierpathologie, LMU München, 2017.

**Tabelle 3: Überblick über das gewonnene Probenmaterial in der *Munich MIDY- Pig Biobank***

Organsystem	Organ/Gewebe	Probenanzahl pro Organ/Gewebe	Proben
<b>Herzkreislaufsystem</b>	<b>Herz</b>	Rechtes und linkes ventrikuläres (38) und atriales (20) Myokard, Herzklappen (8)	PE, EL,CRYO, -80°C
	<b>Blutgefäße</b>	Thorakale und abdominale Aorta (24), Karotiden (12), Jugularvenen (12), Koronargefäße (20)	PE, EL,CRYO, -80°C
<b>Respirations-trakt (RT)</b>	<b>Oberer RT</b>	Nasenseptum (2), Larynx (1), Trachea (á 2 Proben vom proximalen, medialen und distalen Teil)	PE
	<b>Lunge</b>	Lungenparenchym (90), Hauptbronchien (8)	PE, EL,CRYO, -80°C
<b>Hepato-pankreatisches System</b>	<b>Leber</b>	Leberparenchym (74), Gallenblase (1)	PE, EL,CRYO, -80°C
	<b>Pankreas</b>	Pankreasparenchym (100), Pankreatikoduodenal-Lymphknoten (2)	PE, EL,CRYO, -80°C
<b>Gastro-intestinal-trakt</b>	<b>Zunge, Speicheldrüsen, Ösophagus</b>	Zunge (4), mandibuläre Speicheldrüse (2), Ohrspeicheldrüse (2), Ösophagus (á 4 Proben vom proximalen und distalen Teil)	PE
	<b>Magen</b>	Kardiadrüsenzzone, Fundus, und Pylorusdrüsenzzone (á 56 Proben)	PE, PIE, EL,CRYO, -80°C
	<b>Darm</b>	Jejunum (70), Duodenum, Ileum, Caecum, Colon (á 35 Proben), Papilla ilealis (1), Mesenterial- (2) und Dickdarm- (2) Lymphknoten	PE, PIE, EL,CRYO, -80°C
	<b>Ingesta/Fäzes</b>	Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon (á 10 Proben).	-80°C
<b>Urogenitalsystem</b>	<b>Niere</b>	Frisches und perfusionsfixiertes Gewebe: Kortex (55), äußere (50), und innere Zone des Nierenmarks (50)	PE, PIE, EL,CRYO, -80°C
	<b>Unterer Harntrakt</b>	Ureter (á 2 Proben vom proximalen, medialen und distalen Teil), Harnblase (Corpus: 4, Trigonum: 2 Proben), Urethra (2)	PE
	<b>Genitaltrakt</b>	Ovarien (6), Uterus (24), Vagina (9)	PE, EL,CRYO
<b>Immunsystem</b>	<b>Milz, Thymus, Knochenmark, Tonsille, periphere Lymphknoten</b>	Milz (24), Thymus (2), sternales Knochenmark (2), Tonsille (2), superfizielle Inguinallymphknoten (7), axilläre Lymphknoten (2)	PE, CRYO, -80°C
<b>Endokrines System</b>	<b>Schilddrüse, Hypophyse,</b>	Schilddrüse (20), Hypophyse (2), Nebenniere (1)	PE, CRYO, -80°C



<b>Nebenniere</b>			
<b>Nervensystem</b>	<b>Gehirn</b>	Neokortex (2), zerebellärer Kortex (2), Nucleus caudatus (2), Thalamus (2), Hippocampus (2), Hypothalamus (2), Pons (2), Frontalhirn histologische Standardschnitte (6), Trigeminalganglien (2)	PE, -80°
	<b>Nerven</b>	Nervus vagus, Nervus ischiadicus, Nervus fibularis communis, Nervus radialis (proximaler und distaler Teil), Nervus ulnaris (proximaler und distaler Teil), Nervus tibialis (á 11 Proben), Truncus sympathicus (5)	PE, EL, -80°C
	<b>Rückenmark</b>	Zervikales Rückenmark, thorakale Intumeszenz, lumbale Intumeszenz (á 12 Proben), Dorsalwurzelganglien (DRG, á 9 Proben des thorakalen und lumbalen DRG)	PE, CRYO, -80°C
<b>Integument</b>	<b>Haut</b>	Oberschenkelinnenseite (18), Perineum (9), Rüssel (9), Klauen (á 1 Probe der medialen und lateralen Klaue der Vorder- und Hinterbeine)	PE, PIE, EL, CRYO, -80°C
	<b>Milchdrüse</b>	Cranialer und vorletzter Komplex (á 8 Proben)	PE, -80°C
<b>Fettgewebe</b>	<b>Subkutanes und viszerales Fett</b>	Subkutanes Fettgewebe (á 18 Proben vom Abdomen und vom Rücken), viszerales Fettgewebe (á 18 Proben des mesenterialen und perinealen Fettgewebes)	PE, CRYO, -80°C
<b>Muskulo-skelettales System</b>	<b>Skelettmuskeln</b>	Musculus triceps brachii, Musculus (gluteo)biceps, Musculus longissimus lumborum, Musculus tibialis cranialis, Diaphragma (á 17 Proben)	PE, PIE, EL, CRYO, -80°C
	<b>Knochen und Gelenke</b>	Femur (1), Radius (1), Ulna (1, Olecranon), Tibia (1), Synovialmembran des Kniegelenks (1)	PE
<b>Spezielle Sinnesorgane</b>	<b>Augen</b>	Glaskörper (1), vorderer Teil des Augapfels (3), Linse (3), Retina (3), Augenhintergrund (2).	PE, -80°C
<b>Körperflüssigkeiten</b>		Urin (60), Blutserum (60), Blutplasma (60), Zerebrospinalflüssigkeit (10), Synovialflüssigkeit (4)	PE, PIE, EL, CRYO, -80°C

Die angegebene Anzahl der Proben bezieht sich auf die pro Tier gewonnenen Proben. **Probenprozessierung:** Proben für morphologische Analysen wurden in 4%iger Formaldehydlösung, 2,5%iger – 6,25%iger Glutaraldehydlösung, Methacarnfixans oder 96%igem Ethanol fixiert. Abkürzungen: **PE:** Paraffineinbettung; **PIE:** Plastikeinbettung in GMA/MMA; **EL:** Eponeinbettung für die Präparation von Semidünnschnitten für (quantitative) morphologische Analysen und Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie; **CRYO:** Präparation von gefrorenen Proben für die Gefrierschnitthistologie; **-80°C:** Kryokonservierung der Proben für molekularbiologische Analysen (z.B. RNA-, Protein-, Metaboliten-Abundanzanalysen). Tabelle modifiziert nach Blutke et al. (2017), mit freundlicher Genehmigung des Autors (PD Dr. A. Blutke, Institut für Tierpathologie, LMU München).

### **3.2 Ziel der Arbeit**

Im vorliegenden Dissertationsprojekt wurde umfangreiches Probenmaterial (Organ- und Gewebeproben sowie diverse Körperflüssigkeiten) langzeitdiabetischer *INS<sup>C94Y</sup>* transgener Schweine aus der *Munich MIDY-Pig Biobank* im Hinblick auf etwaige Dm-assozierte Alterationen untersucht.

Das Untersuchungsspektrum umfasste die Bestimmung von funktionell relevanten Parametern sowie qualitative und quantitativ-morphologische (stereologische) Analysen. Besonderes Augenmerk wurde auf Proben von Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten gelegt, bei denen das Auftreten Dm-assoziierter Alterationen beim Menschen bzw. anderen Dm-Tiermodellen beschrieben wurde (Pankreas, Niere, Gefäße, Nerven, Urin). Hierbei wurden Parameter untersucht, die etablierte Indikatoren für Dm-assozierte Alterationen darstellen oder eine relevante Rolle in deren Pathogenese spielen.

Das Auge hingegen, das Manifestationsort der diabetischen Retinopathie ist, war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Untersuchung des Auges auf das Auftreten Dm-assoziierter Veränderungen bei zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen erfolgte im Institut für Tierphysiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg (Kleinwort et al. 2017).

### **3.3 Morphologische Untersuchung des Pankreas**

#### **3.3.1 Probennahme und Paraffineinbettung**

Nach der Euthanasie der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine bzw. der Kontrolltiere und der Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Bauchspeicheldrüse schnellstmöglich entnommen und weiter prozessiert.

Dazu wurde pankreasfremdes Gewebe abpräpariert und das Organ gewogen.

Zur systematisch zufälligen Probennahme wurde die Bauchspeicheldrüse in planparallele, gleich dicke Scheiben von 1,0 cm lamelliert (Albl et al. 2016). Die Scheiben wurden jeweils auf die rechte Seite gelegt und ein Punktraster (Punktabstand 1 cm) auf die Scheiben gelegt. Alle Punkte des Rasters, die das Pankreasgewebe trafen, wurden gezählt und durch die gewünschte Probenanzahl 20 geteilt (der Quotient wird im Folgenden als Y bezeichnet). Bei einer zufälligen Zahl X (generiert durch einen Zufallsgenerator (Lang 2016)) zwischen 1 und 20 wurde die erste Probe mit einem Volumen von 1 cm<sup>3</sup> entnommen. Die nächste Probennahme erfolgte an dem Punkt X+Y, die dritte Probe an dem Punkt X+2 x Y, die 4. an dem Punkt X+3 x Y. Diesem Schema folgend wurden 20 Proben (bis X+20 x Y) gewonnen (Albl et al. 2016). Die Gewebestücke wurden in beschriftete Gewebekapseln gelegt und in 4%igem Paraformaldehyd (VWR international, Deutschland) (pH-Wert: 7) bei Raumtemperatur für 2,4 bis 4,8 Stunden fixiert.

Für die Paraffineinbettung wurden die Proben zunächst mithilfe eines Autotechnikons (Histomaster Modell 2050/Di, Bavimed, Deutschland) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) entwässert (Aqua dest., 30 Minuten; 70%iger Alkohol, 2 x 1,5 Stunden; 96%iger Alkohol, 2 x 1,5 Stunden; 100%iger Alkohol, 2 x 1,5 Stunden; Xylol, 2 x 0,5 Stunden). Danach erfolgte eine Inkubation in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) für 1,5 Stunden, in Paraffin (Sherwood Medical, USA) für zunächst 2 Stunden und dann nochmals in Paraffin (Sherwood Medical, USA) für 3 Stunden bei 60°C.

Nach der Durchtränkung mit Paraffin (Sherwood Medical, USA) wurden die Proben in kleinen Metallschälchen mit flüssigem Paraffin (Sherwood Medical, USA) ausgegossen und nach dem Erkalten aus den Schälchen gelöst. Hierfür wurde die Ausgießstation TBS 88 Paraffin Embedding (MEDITE GmbH, Deutschland) verwendet.

Nach der Einbettung der Proben in Paraffin wurden mithilfe eines Mikrotoms (HM 315, Mikrom GmbH, Deutschland) 3 µm dicke Schnitte erstellt und diese zur Glättung in ein Wasserbad (Wassertemperatur: 37°C) verbracht. Danach wurden die Schnitte auf mit Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Objektträger (Starfrost, Engelbrecht, Deutschland) aufgezogen. Die Trocknung erfolgte in einem Inkubator (Mettler, Deutschland) bei 37°C für 24 Stunden.

### **3.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Pankreasschnitte**

Zunächst wurden die Paraffinschnitte zur Entparaffinierung für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) eingehängt und danach in absteigender Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (100%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 70%iger Alkohol) rehydriert. Die Färbung mit Hämatoxylin erfolgte für 4 Minuten in Mayer's Hämalun-Lösung (Merck, Deutschland). Durch 4 minütiges Wässern unter warmem Leitungswasser wurden Farbüberstände entfernt. Zur Differenzierung wurden die Schnitte nun in 0,5%iger Salzsäure (Roth, Deutschland) zwei bis fünfmal eingetaucht und dann erneut 4 Minuten unter warmem Leitungswasser gewässert.

Die Gegenfärbung mit Eosin erfolgte für 2 Minuten in 0,5%iger Eosinlösung (Merck, Deutschland). Farbüberschüsse wurden mit Aqua dest. abgespült und die Schnitte anschließend durch Eintauchen in eine aufsteigende Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (70%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 100%iger Alkohol) dehydriert. Zuletzt wurden sie in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) getaucht und mithilfe von Histokitt (Engelbrecht, Deutschland) mit Deckgläschen (Menzel GmbH & Co KG, Deutschland) eingedeckelt.

### **3.3.3 Immunhistochemische Darstellung der $\beta$ -Zellen in den**

#### **Langerhans'schen Inseln des Pankreas**

Für die Detektion der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen in den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse wurden immunhistochemische Analysen unter der Verwendung von Antikörpern gegen Insulin durchgeführt. Dazu wurde die indirekte Peroxidase (POD)-Methode angewendet.

Zunächst wurden die Schnitte für 20 Minuten in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) entparaffiniert, durch Eintauchen in eine absteigende Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (100%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 70%iger Alkohol) rehydriert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Vermeidung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 15 Minuten in eine 1%ige Wasserstoffperoxidlösung eingehängt und anschließend in tris-buffered saline (TBS)-Puffer (pH-Wert 7,4) 10 Minuten gewaschen. Im nächsten Schritt wurde Normalserum von Kaninchen (MP Biomedicals, Frankreich) in der Verdünnung 1:10 für 20 Minuten auf die Schnitte aufgetragen, um unspezifische Bindungen mit den folgenden Antikörpern zu reduzieren.

Nun wurde der Erstantikörper (Meerschwein, Anti Insulin, Dako, Nordamerika) mit TBS-Puffer (pH 7,4) 1: 500 verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurde der Erstantikörper abgewaschen (in TBS-Puffer (pH 7,4) für 10 Minuten) und der Zweitantikörper (Kaninchen, Anti Meerschwein, Dako, Nordamerika) für 50 Minuten aufgetragen (ebenfalls verdünnt mit TBS-Puffer (pH 7,4) auf 1: 50).

Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift für 5 Minuten in TBS-Puffer (pH 7,4). Um die Immunreaktion sichtbar zu machen, wurde Diaminobenzidin (DAB, Tem-En-Tec Diagnostics, Dänemark), gelöst in destilliertem Wasser, aufgeträufelt und nach Sichtbarwerden der Farbreaktion mit Leitungswasser abgewaschen.

Zuletzt wurde das Pankreasgewebe mit einer Hämalaun-Färbelösung nach Mayer (Merck, Deutschland) gefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (70%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 100%iger Alkohol) dehydriert und in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) eingehängt.

Das Befestigen der Deckgläschen (Menzel GmbH & Co KG, Deutschland) erfolgte mittels Histokitt (Engelbrecht Deutschland).

## **TBS**

TRIS Base (Roth, Deutschland)	60,6 g
Natriumchlorid (AppliChem, Deutschland)	87,6 g
Aqua dest.	1 l

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

### **3.3.4 Quantitativ-stereologische Analysen an Pankreasproben**

Bei jedem *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schwein sowie jedem Kontrolltier wurden Schnitte aus Organproben von 20 systematisch zufällig ausgewählten Pankreaslokalisationen (siehe Probengewinnung, 3.3.1) ausgewertet.

Zur quantitativ-stereologischen Schätzung des Pankreasvolumens, der Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas und des gesamten Volumens der  $\beta$ -Zellen wurde das Olympus Visiomorph<sup>TM</sup> Bildanalyse-System (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark), welches mit einem Lichtmikroskop (BX41, Olympus) gekoppelt ist, verwendet. Die Bilder werden hierbei über eine Kamera (DP72, Olympus) in der jeweiligen mikroskopischen Vergrößerung auf einen Monitor projiziert.

Das Volumen des Pankreas ( $V_{\text{Pan}}$ ) wurde durch Division des Pankreasgewichts durch die Dichte der Bauchspeicheldrüse bestimmt. Die Dichte von frischem Schweine-Pankreasgewebe wurde mittels Submersionsmethode ermittelt (Scherle

1970). Diese beträgt beim Schwein ca.  $1,062\text{g/cm}^3$  (Albl et al. 2016). Die Volumenberechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$V_{(\text{Pan})} = m_{(\text{Pan})} / \rho_{(\text{Pan})}$$

$V_{(\text{Pan})}$  = Volumen des Pankreas

$m_{(\text{Pan})}$  = Gewicht des Pankreas

$\rho_{(\text{Pan})}$  = Dichte des Pankreas

Mithilfe der Stereologie-Software newCAST (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) wurden die immunhistochemisch behandelten Pankreasschnitte ausgewertet und die Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas bestimmt. Durch Umfahren des Pankreasgewebes wurden die Gesamtfläche der Gewebeanschnitte des Pankreas markiert und danach, unter Verwendung des newCAST Programms, systematisch zufällig die auszuwertenden Regionen bestimmt. Hierzu wurden bei 100facher Vergrößerung jeweils 5% der Gewebeprofile in allen Schnitten ausgewertet.

Über die ausgewählten Areale wurden 2 Punktraster unterschiedlicher Dichte (16 Punkte pro Gesichtsfeld, bzw. 625 Punkte pro Gesichtsfeld) gelegt, um die Kompartimente mit unterschiedlicher Volumendichte auszuwerten (Howard und Reed 2005). Alle Punkte des 16-Punkte-Rasters, die Pankreasgewebe trafen, wurden gezählt und alle Punkte des 625-Punkte-Rasters, die ICH-positive  $\beta$ -Zellen trafen.

Anschließend wurden die Werte des großen Punktrasters mit einem Multiplikationsfaktor von 39,0625 (=  $625/16$ ) multipliziert.

Die Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas ( $V_{V(\beta\text{-Zellen/Pan})}$ ) wurde wie folgt berechnet:

$$\hat{V}_{V(\beta\text{-Zellen/Pan})} = A_{A(\beta\text{-Zellen/Pan})} = \frac{\sum_{i=1}^n Pt_{(\beta\text{-Zellen})i}}{\sum_{i=1}^n Pt_{(Pan)i}}$$

$\hat{V}_{V(\beta\text{-Zellen/Pan})}$  = stereologischer Schätzwert für die Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas

$A_{A(\beta\text{-Zellen/Pan})}$  = Flächenanteil der  $\beta$ -Zellen an der Pankreasschnittfläche

$Pt_{(\beta\text{-Zellen})i}$  = Punkte, die IHC-positive  $\beta$ -Zellen treffen im i-ten Schnittpräparat

$Pt_{(Pan)i}$  = Punkte, die Pankreasgewebe treffen im i-ten Schnittpräparat

n = Anzahl der Schnittpräparate

Das gesamte Volumen der  $\beta$ -Zellen ( $V_{(\beta\text{-Zellen,Pan})}$ ) im Pankreas wurde durch Multiplikation des Pankreasvolumens mit der Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas bestimmt.

$$\hat{V}_{(\beta\text{-Zellen, Pan})} = V_{(Pan)} \cdot \hat{V}_{V(\beta\text{-Zellen/Pan})}$$

$\hat{V}_{(\beta\text{-Zellen, Pan})}$  = stereologischer Schätzwert des Gesamtvolumens der  $\beta$ -Zellen im Pankreas

$V_{(Pan)}$  = Volumen des Pankreas

$\hat{V}_{V(\beta\text{-Zellen/Pan})}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas

### 3.4 Morphologische Untersuchung der Nieren

#### 3.4.1 Gewinnung der Nierenproben

Jeweils die linken Nieren der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine sowie der Kontrolltiere wurden bei der Sektion der Tiere nach Eröffnung des Abdomens als erstes Organ entnommen und mittels Fallstromperfusion (Wanke et al. 2001, Albl et al. 2016) fixiert. Dazu wurden zwei Kanister mit körperwarmer, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bzw. mit 4%iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (VWR international, Deutschland) vorbereitet. An die Kanister wurden Infusionsschläuche angebracht und diese mit einem Dreiwegehahn verbunden. Die Fallstromhöhe betrug 1,5 Meter.



Das Schlauchende des Infusionsschlauchs (alternativ eine weitleumige Perfusionskanüle) wurde in die Arteria renalis der Nieren eingeführt. Nun erfolgte die Perfusion der Nieren mit PBS für ca. 2 Minuten, bis die Nieren einen blassen Farbton angenommen hatten und die austretende Flüssigkeit aus der Vena renalis klar geworden war. Anschließend wurde die Nieren für 6 Minuten mit der 4%igen PFA-Lösung (VWR international, Deutschland) perfundiert (Albl et al. 2016). Nach Abschluss der Fallstromperfusion wurden die Nieren gewogen, dekapsuliert und senkrecht zu ihrer Längsachse in ca. 1 cm dicke, planparallele Scheiben lamelliert. Die Nachfixierung erfolgte für 24 Stunden ebenfalls in 4%iger PFA-Lösung (VWR international, Deutschland).

Pro perfusionsfixierter Niere wurden 10 Kortex-Proben gewonnen (die Probennahme erfolgte systematisch zufällig (Nyengaard 1999, Albl et al. 2016)) und für die Kunststoff- bzw. Eponeinbettung weiter prozessiert.

Die jeweils rechten Nieren der Schweine wurden nach Entnahme des Darmkonvoluts aus den Tierkörpern herausgelöst und ebenfalls gewogen. Wie bei den perfundierten Nieren erfolgte auch hier eine Lamellierung in gleich dicke, planparallele Scheiben. Von den nicht perfusionsfixierten Nieren wurden Proben für die Paraffineinbettung gewonnen. Zudem wurden Gewebeproben für molekularbiologische Untersuchungen bei -80°C asserviert.

## **PBS**

Kaliumdihydrogenphosphat (AppliChem, Deutschland)	0,25 g
Natriumchlorid (AppliChem, Deutschland)	8,0 g
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (AppliChem, Deutschland)	1,46 g
Aqua dest.	1 l

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

### 3.4.2 Ermittlung des Nierenvolumens ( $V_{\text{(Niere)}}$ )

Das Volumen der perfusionsfixierten sowie der nicht perfusionsfixierten Nieren wurde anhand der Nierengewichte und der spezifischen Dichte der Organe berechnet.

Die Dichte perfusionsfixierter Schweinenieren beträgt ca.  $1,077 \text{ g/cm}^3$ , die der nicht perfusionsfixierter Nieren ca.  $1,044 \text{ g/cm}^3$  (Albl et al. 2016).

$$V_{\text{(Niere perf.)}} = m_{\text{(Niere perf.)}} / \rho_{\text{(Niere perf.)}}$$

$V_{\text{(Niere perf.)}}$  = Volumen der perfusionsfixierten Niere

$m_{\text{(Niere perf.)}}$  = Gewicht der perfusionsfixierten Niere

$\rho_{\text{(Niere perf.)}}$  = Dichte der perfusionsfixierten Niere

Die Volumina der nicht perfusionsfixierten Nieren wurden auf dieselbe Weise ermittelt.

### 3.4.3 Bestimmung der Volumendichte ( $V_{\text{V(Kortex/Niere)}}$ ) und des gesamten

**Volumens ( $V_{\text{(Kortex, Niere)}}$ ) des Nierenkortex in den perfusionsfixierten**

**Nieren**

Für die Ermittlung der Volumendichte des Nierenkortex in der Niere ( $V_{\text{V(Kortex/Niere)}}$ ) wurden die Lamellen der perfusionsfixierten Niere auf ein Blatt Papier gelegt und die Rinden-Mark-Grenze mit einem Gewebestift (Pelikan Colorella Star Fasermarker, Deutschland) auf dem Gewebe der Nierenscheibe nachgezeichnet. Zusätzlich wurden zwei Maßstäbe mit Zentimetereinheit neben die Nierenscheiben platziert. Nun wurde mit einer Fotokamera (Nikon D40, Nikon, Japan) ein Foto der

Nierenscheiben samt Messskalen senkrecht zur Oberfläche gemacht und dieses auf ein DinA4-Papier ausgedruckt.

Durch die planimetrische Bestimmung der Flächen der kompletten Nierenschnittflächen und der Flächenanteile des Nierenmarks an der Nierenschnittfläche wurde die Volumendichte des Nierenkortex in der Niere nach dem Prinzip von Delesse ermittelt (Wanke 2016).

Hierzu wurde das Videoplan Bildanalyse-System (Zeiss-Kontron, Deutschland) verwendet, an das ein Cursor sowie eine digitalisierende Unterlage angeschlossen sind. Mit dem Cursor können zweidimensionale Objekte umfahren werden und die Fläche des umfahrenen Bereichs mithilfe der Videoplan-Software berechnet werden. Die Kalibrierung des Systems erfolgte durch Messung der Skaleneinheiten auf den Fotografien.

Nachfolgende Formeln zeigen die Ermittlung der Volumendichte der Nierenrinde in der Niere:

$$\hat{V}_{V(\text{Kortex/Niere})} = A_{A(\text{Kortex/Niere})} = \frac{\sum_{i=1}^n A_{(\text{Kortex})i}}{\sum_{i=1}^n A_{(\text{Niere})i}}$$

$\hat{V}_{V(\text{Kortex/Niere})}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte des Nierenkortex in der Niere

$A_{A(\text{Kortex/Niere})}$  = Flächenanteil des Nierenkortex an allen Nierenscheiben

$A_{(\text{Kortex})i}$  = Flächenwert des Nierenkortex in der i-ten Nierenscheibe

$A_{(\text{Niere})i}$  = Flächenwert der i-ten Nierenscheibe

n = Anzahl der Nierenscheiben

Die Berechnung der Flächenwerte des Nierenkortex erfolgte durch Subtraktion der Flächenwerte des Nierenmarks von den Flächenwerten der Nierenscheiben.

$$A_{(Kortex)i} = A_{(Niere)i} - A_{(Mark)i}$$

$A_{(Kortex)i}$  = Flächenwert des Nierenkortex in der i-ten Nierenscheibe

$A_{(Niere)i}$  = Flächenwert der i-ten Nierenscheibe

$A_{(Mark)i}$  = Flächenwert des Nierenmarks in der i-ten Nierenscheibe

Das gesamte Volumen des Nierenkortex ( $V_{(Kortex, Niere)}$ ) in der perfusionsfixierten Niere wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\hat{V}_{(Kortex, Niere)} = V_{(Niere)} \cdot \hat{V}_{V(Kortex/Niere)}$$

$\hat{V}_{(Kortex, Niere)}$  = stereologischer Schätzwert des gesamten Volumens des Nierenkortex in der Niere

$V_{(Niere)}$  = Volumen der perfusionsfixierten Niere

$\hat{V}_{V(Kortex/Niere)}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte des Nierenkortex in der Niere

### 3.4.4 Kunststoffeinfettung der Nierengewebeproben

Für die Einbettung der Nierenproben in 2-Hydroxyethylmetacrylat (GMA)/Methylmetacrylat (MMA) erfolgte zunächst ein Zuschnitt der Proben unter Anwendung des Orientator-Verfahrens zur Randomisierung der Position der Anschnittsebene (IUR-Ebenen; isotropic uniform random) (Mattfeldt et al. 1990, Nyengaard und Gundersen 2006, Albl et al. 2016). Um die für die Einbettung vorgesehene Schnittfläche der Proben zu kennzeichnen, wurden die Proben in den Gewebekapseln mit kleinen Schwämmchen fixiert, wobei die generierte IUR-Ebene jeweils zum Kapselboden zeigte.

Danach wurden die Proben für 16 Stunden in einem Autotechnikon (Citadel 1000, Shandon GmbH, Deutschland) prozessiert und mittels aufsteigender Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (30%iger Alkohol, 2 x 1 Stunde; 50%iger Alkohol, 2 x 1 Stunde; 70%iger Alkohol, 2 x 2 Stunden; 96%iger Alkohol, 2 x 2 Stunden und 2 x 3

Stunden) entwässert. Nun wurden die Proben für 24 Stunden in ein GMA/MMA Gemisch (Verhältnis 1:1) gegeben und danach für 2,5 bis maximal 4 Stunden in Lösung A (siehe unten) inkubiert.

Für das Ausgießen wurden kleine Plastikgefäße verwendet. Nach Platzierung der Probe auf dem Boden des Plastikgefäßes, wurde das Gefäß mit 40 ml Lösung A und 60 µl N-N-Dimethylanilin (Merck, Deutschland), dem Initiator des Polymerisierungsvorgangs, aufgefüllt, verschlossen und in einem Wasserbad für 12 Stunden in einem Kühlschrank gelagert.

Nach Entfernen der ausgehärteten Kunststoffproben aus den Plastikgefäßen wurden von diesen mit einem Rotationsmikrotom (HM 360, Mikrom GmbH, Deutschland) ca. 1 µm dicke Schnitte angefertigt und mit verschiedenen Färbeverfahren gefärbt (siehe 3.4.5).

Folgende Chemikalien wurden für die Nierenprozessierung verwendet:

### **Lösung A**

Benzoylperoxid (Merck, Deutschland)	1,688 g
Methylmetacrylat (Merck, Deutschland)	100 ml
2-Hydroxyethylmetacrylat (Merck, Deutschland)	300 ml
Ethylenglykolmonobuthylether (Merck, Deutschland)	80 ml
Polyethylenglykol 400 (Merck, Deutschland)	10 ml

## **3.4.5 Färbungen der Kunststoffschnitte**

### **3.4.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Kunststoffschnitte wurden zuerst für 30 Minuten in Mayer's Hämalaun-Lösung (Merck, Deutschland) getaucht. Anschließend wurden die Farbüberschüsse 10 Minuten lang mit Leitungswasser abgewaschen. Zur Differenzierung wurden die

Objektträger für 10 Sekunden in 1%igen HCL-Ethyl-Alkohol (Merck, Deutschland) getaucht und erneut unter Leitungswasser für 10 Minuten gewässert.

Nun wurden die Schnitte 5 Minuten auf einer Heizplatte getrocknet und danach für 20 Minuten mit Eosin-Phloxin (Merck, Deutschland) gegengefärbt. Die Farbüberstände wurden zweimal für jeweils 2 Minuten mit Aqua dest. entfernt. Nach Trocknung der Schnitte auf der Heizplatte für 5 Minuten wurden die Objektträger in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) verbracht und unter Verwendung von Histokit (Engelbrecht, Deutschland) mit Deckgläsern (Menzel GmbH & Co KG, Deutschland) versehen.

#### **3.4.5.2 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)**

Im ersten Schritt wurden die Objektträger mit den Kunststoffschnitten in 1%ige Perjodsäurelösung verbracht. Nach 15 Minuten wurden die Schnitte durch dreimaliges Eintauchen in Aqua dest. für jeweils 3 Sekunden gewaschen und anschließend für 45 Minuten in Schiffscher Reagenz (Roth, Deutschland) eingetaucht. Um Farbüberstände zu entfernen, wurden die Objektträger 30 Minuten lang unter fließendem warmem Leitungswasser gewässert und danach 5 Minuten auf einer Heizplatte getrocknet. Nun erfolgte die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalan (Merck, Deutschland) für 20 Minuten und erneutes Wässern unter Leitungswasser für 10 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte 1 Sekunde lang in 1%igen HCL-Ethyl-Alkohol (Merck, Deutschland) getaucht und nochmals 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Zur Trocknung wurden die Objektträger wieder auf die Heizplatte gelegt und anschließend in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) eingetaucht. Das Eindecken erfolgte mit Histokit (Engelbrecht, Deutschland).

Verwendete Chemikalien:

### **1%ige Perjodsäurelösung:**

Perjodsäure (Roth, Deutschland)	10 g
Aqua dest.	1000 ml

### **3.4.5.3 Versilberung nach Rambourg kombiniert mit der PAS-Reaktion**

Wie bei der PAS-Reaktion wurden die Schnitte zunächst für 15 Minuten in 1%ige Perjodsäurelösung getaucht. Das Abspülen der Rückstände erfolgte mit Aqua dest. für 10 Sekunden.

Während der Inkubation in der Perjodsäurelösung wurde die Silbermethenaminlösung hergestellt und im Wasserbad auf 65°C vorgewärmt. Die Objektträger wurden dann für 25 Minuten bei weiterhin 65°C in die Silbermethenaminlösung verbracht und die Versilberung nach Ablauf der Zeit unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei Ausreichender Versilberung wurden die Schnitte anschließend für 10 Sekunden mit Aqua dest. gewaschen und für 10-20 Sekunden in 0,1%ige Goldchlorid-Lösung (Merck, Deutschland) getaucht. Danach erfolgte erneutes Waschen in Aqua dest. für 10 Sekunden. Nun wurden die Objektträger für 60 Sekunden in eine 2%ige Natriumthiosulfat-Lösung getunkt und wiederum mit Aqua dest. gespült (10 Sekunden). Nach dem Trocknen der Schnitte für 5 Minuten auf einer Heizplatte wurden sie in Schiffsche Reagenz (Roth, Deutschland) getaucht und dort 45 Minuten belassen. Für die Entfernung von Farbüberschüssen folgte 30 minütiges Wässern unter warmem Leitungswasser. Nach der Trocknung der Schnitte auf der Heizplatte konnte die Gegenfärbung in Mayer's Hämalaun (Merck, Deutschland) für 30 Minuten durchgeführt werden.

Die restlichen Schritte erfolgten analog zu PAS-Reaktion (siehe 3.4.5.2).

Verwendete Chemikalien:

**1%ige Perjodsäurelösung:**

Perjodsäure (Roth, Deutschland)	10 g
Aqua dest.	1000 ml

**Silbermethenaminlösung:**

3%ige Methenaminlösung, bestehend aus:	72 ml
Methenamin (Merck, Deutschland)	2,16 g
Aqua dest.	72 ml
5%ige Silbernitratlösung, bestehend aus:	8 ml
Silbernitrat (Merck, Deutschland)	5 g
Aqua dest.	100 ml
2%ige Borax-Lösung, bestehend aus:	8 ml
Borax (Merck, Deutschland)	0,4 g
Aqua dest. (kochend)	20 ml

Die Silbernitratlösung wurde unter ständigem Rühren zu der Methenaminlösung zugegeben, bis sich der weiße Niederschlag aufgelöst hatte. Danach wurde noch die Borax-Lösung zugegeben und die entstandene Lösung filtriert.

**2%ige Natriumthiosulfatlösung:**

Natriumthiosulfat (Merck, Deutschland)	2 g
Aqua dest.	100 ml

**3.4.6 Bestimmung der Volumendichte ( $V_{V(\text{Glom/Kortex})}$ ) und des gesamten****Volumens ( $V_{(\text{Glom, Kortex})}$ ) der Glomerula im Nierenkortex**

Die Volumendichte der Glomerula in der Nierenrinde ( $V_{V(\text{Glom/Kortex})}$ ) wurde an HE-gefärbten Schnitten von in Kunststoff eingebetteten Nierenproben bestimmt (siehe



3.4.4 und 3.4.5.1). Bei jedem Tiere wurden von den zehn in Epon eingebetteten Nierenkortex-Proben fünf Nierenlokalisationen analysiert, die mithilfe eines Zufallszahlengenerators (Lang 2016) bestimmt wurden. Die Größe der Gewebeproben betrug ca.  $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ .

Zur Ermittlung der Volumendichte der Glomerula in der Nierenrinde wurde das Olympus Visiomorph™ Bildanalyse-System (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark), welches mit einem Lichtmikroskop (BX41, Olympus) gekoppelt ist, verwendet. Die mikroskopischen Bilder, die vom Lichtmikroskop über die Kamera (DP72, Olympus) auf den Monitor projiziert werden, wurden unter Verwendung eines 10er Okulars und eines 40er Objektivs ausgewertet.

Ein Gewebeschnitt jeder Nierenlokalisation wurde mäanderförmig durchmustert und jedes zweite Gesichtsfeld ausgewertet. Um Glomerulumanschnittsprofile mit unterschiedlicher Größe mit gleicher Wahrscheinlichkeit auszuwerten, wurden alle in einem Gesichtsfeld nur zum Teil abgebildeten Glomerulumprofile verbotenen und erlaubten Linien zugeordnet. Zu den verbotenen Linien zählten der obere Bildrand und eine im linken Bildteil eingeblendete vertikale Linie, zu den erlaubten Linien der untere Bildrand und eine im rechten Bildteil eingeblendete vertikale Linie (Wanke 1996, Howard und Reed 2005).

Nun wurde mithilfe der Stereologie-Software newCAST (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) ein Punktraster mit 225 Punkten über das Gesichtsfeld gelegt und die Trefferpunkte ausgezählt. In eine Tabelle wurden zum einen die Anzahl der Punkte, die Nierengewebe trafen, eingetragen und zum anderen die Anzahl der Punkte, die nur Glomerulumprofile trafen.

Die Bestimmung der Volumendichte der Glomerula im Nierenkortex erfolgte durch Division der Summe der Punkte, die Glomerulumanschnittsprofile trafen, durch die Summe der Punkte, die die Anschnittsfläche der Nierenkortex-Probe trafen.

$$\hat{V}_{V(\text{Glom}/\text{Kortex})} = A_{A(\text{Glom}/\text{Kortex})} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Pt}_{(\text{Glom})i}}{\sum_{i=1}^n \text{Pt}_{(\text{Kortex})i}}$$

$\hat{V}_{V(\text{Glom}/\text{Kortex})}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte der Glomerula in der Nierenrinde

$A_{A(\text{Glom}/\text{Kortex})}$  = Flächenanteil der Glomerula an der Nierenkortex-Schnittfläche

$\text{Pt}_{(\text{Glom})i}$  = Punkte, die Glomerulumanschnittprofile treffen im i-ten Schnittpräparat

$\text{Pt}_{(\text{Kortex})i}$  = Punkte, die Nierenkortexgewebe treffen im i-ten Schnittpräparat

n = Anzahl der Schnittpräparate

Das gesamte Volumen der Glomerula ( $V_{(\text{Glom}, \text{Kortex})}$ ) im Nierenkortex wurde anschließend nach folgender Formel bestimmt.

$$\hat{V}_{(\text{Glom}, \text{Kortex})} = \hat{V}_{(\text{Kortex}, \text{Niere})} \cdot \hat{V}_{V(\text{Glom}/\text{Kortex})}$$

$\hat{V}_{(\text{Glom}, \text{Kortex})}$  = stereologischer Schätzwert des gesamten Volumens der Glomerula in der Nierenrinde

$\hat{V}_{(\text{Kortex}, \text{Niere})}$  = stereologischer Schätzwert des gesamten Volumens des Nierenkortex in der Niere

$\hat{V}_{V(\text{Glom}/\text{Kortex})}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte der Glomerula in der Nierenrinde

### 3.4.7 Bestimmung des mittleren Glomerulumvolumens ( $\bar{V}_{(\text{Glom})}$ ) nach

#### Weibel und Gomez

Das mittlere Glomerulumvolumen ( $\bar{V}_{(\text{Glom})}$ ) wurde nach einer Modell-basierten Methode berechnet, in der die Glomerula als Rotationsellipsoid angesehen werden (Weibel und Gomez 1962, Hirose et al. 1982, Wanke 1996). Dabei werden die Anschnittflächen der Glomerula gemessen und das Volumen der Glomerula unter Berücksichtigung eines Form- und eines Größenverteilungskoeffizients (Wanke 1996) geschätzt.

$$\hat{\hat{V}}_{(\text{Glom})(s)} = \frac{\beta}{k} \cdot \bar{a}_{(\text{Glom})}^{1,5}$$

$\hat{\hat{V}}_{(\text{Glom})(s)}$  = stereologischer Schätzwert für das mittlere Glomerulumvolumen (Bezug nehmend auf in GMA/MMA eingebettetes Gewebe)

$\beta$  = Formkoeffizient (= 1,40)

$k$  = Größenverteilungskoeffizient (= 1,04)

$\bar{a}_{(\text{Glom})}$  = arithmetisches Mittel der Flächeninhalte der Glomerulumschnittprofile

Um die Gewebeschrumpfung während der Kunststoffeinführung zu korrigieren, wurde zusätzlich ein Schrumpfungsfaktor für in Kunststoff eingebettete Schweinenieren ( $f_s = 0,894$ ) in die Berechnung miteinbezogen. (Bestimmung des Schrumpfungsfaktors: siehe 3.4.8).

$$\hat{\hat{V}}_{(\text{Glom})} = \hat{\hat{V}}_{(\text{Glom})(s)} / f_s^3$$

$\hat{\hat{V}}_{(\text{Glom})}$  = stereologischer Schätzwert für das mittlere Glomerulumvolumen (vor Einbettung)

$\hat{\hat{V}}_{(\text{Glom})(s)}$  = stereologischer Schätzwert für das mittlere Glomerulumvolumen (Bezug nehmend auf in GMA/MMA eingebettetes Gewebe)

$f_s$  = linearer Schrumpfungskorrekturfaktor für GMA/MMA eingebettetes Schweinenierengewebe

Für die Messung der Glomerulumschnittflächen wurde das Videoplan Bildanalyse-System (Zeiss-Kontron, Deutschland) verwendet, das an ein Lichtmikroskop (Orthoplan; Leitz, Deutschland) gekoppelt ist. Die Bilder werden über eine Kamera (CCTV WV-CD123E; Matsushita, Japan) in der am Mikroskop eingestellten Vergrößerung auf einen Farbmonitor übertragen. Mithilfe eines Cursors, der auf einer digitalisierenden Unterlage bewegt wird, können die am Bildschirm angezeigten Objekte umfahren werden und so deren Fläche bestimmt werden.

Für die Berechnung des mittleren Glomerulumvolumens wurden aus den in Kunststoff eingebetteten Nierenkortexproben pro Tier zufällig (unter Verwendung eines Zufallszahlengenerators (Lang 2016)) fünf Proben ausgewählt und PAS gefärbte Gewebeschnitte angefertigt (siehe 3.4.4 und 3.4.5.2).

Nach Kalibrierung des Analyse-Systems mit Hilfe eines Objekt-Mikrometers (Zeiss, Deutschland) wurden die Schnitte unter Verwendung eines 10er Okulars und eines 25er Objektivs ausgewertet. Dazu wurden die Schnitte mäanderförmig durchmustert und die Kontur aller Glomerulumprofile eines Tieres (durchschnittlich  $142 \pm 32$ ) mit dem Cursor umfahren. Um auch hier keine Glomerulumprofile doppelt auszuwerten, wurden alle in einem Gesichtsfeld nur zum Teil abgebildeten Nierenkörperchen verboten und erlaubten Linien zugeordnet. Zu den verbotenen Linien zählten der obere und linke Bildrand, zu den erlaubten der untere und rechte Rand (Wanke 1996, Howard und Reed 2005).

Unter Verwendung der Analyse-Software wurde das arithmetische Mittel der Flächeninhalte der Glomerulumanschnittsprofile bestimmt.

### **3.4.8 Ermittlung der linearen Schrumpfungskorrekturfaktoren für in**

#### **GMA/MMA bzw. in Epon eingebettete Schweinenierengewebeproben**

Für die Ermittlung der Gewebeschrumpfung bei Einbettung in GMA/MMA bzw. in Epon wurden fünf perfusionsfixierte, zufällig - mithilfe eines Zufallszahlengenerators (Lang 2016) -ausgewählte Nieren von zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen und Wildtypkontrolltieren verwendet. Dazu wurden für die Kunststoffeinbettung ca.  $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ , für die Eponeinbettung ca.  $0,2 \times 0,2 \times 0,2 \text{ cm}^3$  große Gewebeproben der Nieren entnommen und auf eine Folie mit aufgedrucktem Maßstab gelegt.

Die Proben wurden nun auf einem Scanner (OfficeJet G55, Hewlett Packard, Deutschland) platziert und eingescannt. Die dadurch erhaltenen Bilder wurden

ausgedruckt und die Fläche der Nierenproben bestimmt. Hierzu wurde das Videoplan Bildanalyse-System (Zeiss-Kontron, Deutschland) verwendet. Nach Kalibrierung des Systems mit Hilfe des auf den Fotos enthaltenen Maßstabes konnte die Fläche der jeweiligen Proben durch Umfahren ihrer Auflageprofile ermittelt werden.

Die Proben wurden nun einzeln unter Beibehaltung der Auflagefläche in GMA/MMA bzw. in Epon eingebettet (siehe 3.4.4 bzw. 3.4.10) und HE (siehe 3.4.5.1) bzw. Toluidinblau-Safranin gefärbte Schnitte (siehe 3.4.11) der eingebetteten Proben erstellt (Blutke 2016).

Die Flächenwerte der Anschnittsprofile der eingebetteten Nierenproben wurden nun ebenfalls unter Verwendung des Videoplan Bildanalyse-Systems (Zeiss-Kontron, Deutschland) durch Umfahren der Konturen bestimmt.

Der lineare Schrumpfungsfaktor wurde nach folgender Gleichung berechnet (Wanke 1996):

$$f_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n A_{i(s)}}{\sum_{i=1}^n A_i}}$$

$f_s$  = linearer Schrumpfungsfaktor

$A_{i(s)}$  = Flächeninhalt des histologischen Schnittes der i-ten Nierenprobe

$A_i$  = Flächeninhalt der i-ten Nierenprobe im fixierten Zustand vor der Einbettung

$n$  = Anzahl der Nierenproben pro Niere

### **3.4.9 Bestimmung der Volumendichte ( $V_{V(\text{Mes/Glom})}$ ) und des gesamten**

#### **Volumens ( $V_{(\text{Mes, Glom})}$ ) des Mesangiums im Glomerulum**

Die Ermittlung der Volumendichte des Mesangiums im Glomerulum ( $V_{V(\text{Mes/Glom})}$ ) erfolgte an PAS gefärbten Schnitten von in Kunststoff eingebetteten Nierenproben

(siehe 3.4.4 und 3.4.5.2). Die Auswahl der Proben erfolgte analog zur Bestimmung der Volumendichte der Glomerula in der Nierenrinde (siehe 3.4.6).

Unter Verwendung des Olympus Visiomorph™ Bildanalyse-Systems (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) und der Stereologie-Software newCAST (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) wurden je Tier durchschnittlich  $50 \pm 24$  Glomerulumanschnittsprofile bei 200facher Vergrößerung ausgewertet. Hierzu wurden die Schnitte mäanderförmig durchmustert und alle Glomerulumprofile in einem Schnitt ausgewertet. Auch hier kam das Prinzip der verbotenen und erlaubten Linien (siehe 3.4.6) zum Einsatz.

Ein Punktraster mit 256 Punkten wurde über die Glomerulumanschnittsprofile gelegt und alle Punkte gezählt, die das Glomerulumprofil trafen bzw. das Mesangium trafen.

Die Volumendichte des Mesangiums im Glomerulum berechnete sich wie folgt:

$$\hat{V}_{V(\text{Mes/Glom})} = A_{A(\text{Mes/Glom})} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Pt}_{(\text{Mes})i}}{\sum_{i=1}^n \text{Pt}_{(\text{Glom})i}}$$

$\hat{V}_{V(\text{Mes/Glom})}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte des Mesangiums im Glomerulum

$A_{A(\text{Mes/Glom})}$  = Flächenanteil des Mesangiums am Glomerulumanschnittsprofil

$\text{Pt}_{(\text{Mes})i}$  = Punkte, die Mesangium treffen im i-ten Schnittpräparat

$\text{Pt}_{(\text{Glom})i}$  = Punkte, die Glomerulumprofile treffen im i-ten Schnittpräparat

$n$  = Anzahl der Schnittpräparate

Das gesamte Volumen des Mesangiums im Glomerulum ( $V_{(\text{Mes, Glom})}$ ) wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\hat{V}_{(\text{Mes, Glom})} = \hat{V}_{(\text{Glom})} \cdot \hat{V}_{V(\text{Mes/Glom})}$$

$\hat{V}_{(\text{Mes, Glom})}$  = stereologischer Schätzwert des gesamten Volumens des Mesangiums im Glomerulum

$\hat{V}_{(\text{Glom})}$  = stereologischer Schätzwert für das mittlere Glomerulumvolumen

$\hat{V}_{V(\text{Mes/Glom})}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte des Mesangiums im Glomerulum

### **3.4.10 Eponeinbettung der Nierenproben und Anfertigung von Semidünnschnitten**

Die Nierenproben für die Einbettung in Epon wurden wie in 3.4.1 beschrieben systematisch zufällig von den perfusionsfixierten Nieren gewonnen und auf eine Größe von ca. 1 mm<sup>3</sup> zugeschnitten. Die Gewebe-Würfel wurden anschließend in 6,25% Glutaraldehyd (Serva, Deutschland) in PBS-Puffer (pH 7,4) für 48 Stunden bei 8°C fixiert.

Zur weiteren Prozessierung wurden die Proben mehrmals in einer Waschlösung gewaschen und für zwei Stunden in einem Osmiumtetroxid-haltigen, gebrauchsfertigen Fixativ bei 4°C nachfixiert und kontrastiert. Danach wurden die Proben erneut in der Waschlösung gewaschen (dreimalig für jeweils 2 Minuten bei Raumtemperatur) und in einer aufsteigenden Acetonreihe (neoLab, Deutschland) bei 4°C dehydriert (50%, 2 x 70%, 2 x 90%, je 10 Minuten; 3 x 100%, je 20 Minuten).

Nun erfolgte die Inkubation in einem Aceton (neoLab, Deutschland)/Epon-Gemisch (Verhältnis 1:1) für eine Stunde und zweimalig in einem reinen Epon-Gemisch für jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden die infiltrierten Proben in demselben Epon-Gemisch über die Dauer von zwei Tagen bei 60°C egebettet.

Nach der Einbettung wurden die Proben an einem Trimmgerät getrimmt (Ultratrim, Reichert und Jung, Leica Deutschland) und mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert und Jung, Leica, Deutschland) ca. 0,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem Wassertropfen auf die Objektträger (Engelbrecht, Deutschland) übertragen, bei 60°C getrocknet und über einer Flamme fixiert.

Folgende Chemikalien wurden für die Epon-Einbettung benötigt:

**Waschlösung:**

D(+)-Saccharose (neoLab, Deutschland)	6,84 g
Sörensen-Phosphat-Puffer	100 ml

**Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7,4**

Lösung A, bestehend aus:	808 ml
--------------------------	--------

Kaliumdihydrogenphosphat (neoLab, Deutschland)	9,078 g
Aqua dest.	1000 ml

Lösung B, bestehend aus:	192 ml
--------------------------	--------

Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat (neoLab, Deutschland)	11,876 g
Aqua dest.	1000 ml

**Osmiumtetroxid-haltiges Fixativ**

D(+)-Saccharose (neoLab, Deutschland)	6,84 g
Aqua dest.	1 ml
HCl 0,1 N (Merck, Deutschland)	2 ml
Veronalacetat-Puffer	2 ml
2%ige Osmiumtetroxidlösung	5 ml

**2%ige Osmiumtetroxidlösung**

Osmiumtetroxid (chempur, Deutschland)	1 g
---------------------------------------	-----



Aqua bidest.	50 ml
--------------	-------

### **Veronalacetat-Puffer pH 10,3**

Diethylbarbitursäure-Natriumsalz (Merck, Deutschland)	0,147 g
Natriumacetat (neoLab, Deutschland)	0,097 g
Aqua bidest.	5 ml

### **Epon-Gemisch**

Gemisch A, bestehend aus:	41,2 g
---------------------------	--------

Glycid Ether 100 (Serva, Deutschland)	38,32 g
2-Dodecenylbernsteinsäureanhydrid (Serva, Deutschland)	45,30 g

Gemisch B, bestehend aus:	75 g
---------------------------	------

Glycid Ether 100 (Serva, Deutschland)	61,80 g
Methylnadicanhydrid (Serva, Deutschland)	56,34 g

Para-Dimethylaminomethyl Phenol (Serva, Deutschland)	1,5 ml
--	--------

### **3.4.11 Toluidinblau-Safranin-Färbung der Semidünnschnitte**

Die Semidünnschnitte wurden für 45 Sekunden mit Toluidinblau gefärbt und nach einer Waschung in Aqua dest. mit Safranin gegengefärbt. Nach der Trocknung erfolgte das Eindecken der Schnitte mit dem Epon-Gemisch (siehe 3.4.10).

Folgende Färbelösungen wurden verwendet:

### **Toluidinblau**

Toluidinblau O (Roth, Deutschland)	0,8 g
Dinatriumtetraborat (Merck, Deutschland)	1 g
Aqua dest.	100 ml

### **Safranin**

Safranin O (Chroma, Deutschland)	1 g
Dinatriumtetraborat (Merck, Deutschland)	1 g
D(+)-Saccharose (neoLab, Deutschland)	40 g
Formaldehyd 37%ig (Merck, Deutschland)	2-3 Tropfen
Aqua dest.	100 ml

### **3.4.12 Schätzung der numerischen Dichte ( $N_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})}$ ) und der Anzahl der glomerulären Zellen ( $N_{(\text{Zellen}, \text{Glom})}$ ) im Glomerulum mit dem physikalischen Disektor-Prinzip**

Um die numerische Dichte glomerulärer Zellen (Z) - unterteilt in Podozyten (P), Endothelzellen (E) und Mesangiumzellen (M) – im Glomerulum zu ermitteln, wurde die Disektor-Methode angewendet, die eine unverfälschte Bestimmung der Anzahl und der Größe von Partikeln ermöglicht (Sterio 1984). Hierzu wurden Serienschritte von in Epon eingebetteten Nierenkortexproben erstellt, wobei pro Schwein vier zufällig ausgewählte Nierenlokalisationen (Zufallszahlengenerator (Lang 2016)) untersucht wurden. Eine Serie von neun Semidünnschnitten pro Nierenlokalisation mit einer normalen Schnittdicke von 0,5  $\mu\text{m}$  wurde mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert und Jung, Leica, Deutschland) angefertigt und mit Toluidinblau-Safranin (siehe 3.4.11) gefärbt. Die Schnittdicke wurde mit Hilfe des Schichtdickenmessgerätes Filmetrics F20 (Filmetrics Europe GmbH, Deutschland)

überprüft. Hierfür wurden die Schnitte von sechs Tieren (drei transgene Tiere und drei Kontrolltiere) zufällig (Zufallszahlengenerator, (Lang 2016)) ausgewählt. Bei jedem dieser Tiere wurden drei zufällig ausgewählte Semidünnschnitte ausgewertet. Die durchschnittliche Schnittdicke betrug  $0,50\ \mu\text{m} \pm 0,01$ .

Durchschnittlich wurden  $11 \pm 3$  Glomerula pro Tier analysiert. Dafür wurden pro Nierenlokalisierung jeweils zwei Paare von Schnittebenen mit einem definierten Abstand von  $1,5\ \mu\text{m}$  (entspricht ungefähr einem Drittel des minimalen mittleren Durchmessers eines porzinen Podozytenkernanschnittsprofils; Bestimmung siehe 3.4.13) ausgewählt. Mögliche Schnittpaare waren: Schnitt 2 und Schnitt 5, Schnitt 3 und Schnitt 6, Schnitt 5 und Schnitt 8 und Schnitt 6 und Schnitt 9. Schnitt 1 und folglich Schnitt 4 und 7 wurden aufgrund möglicher technischer Mängel des ersten Schnittes aussortiert.

Für die Auswertung wurden die Schnitte unter einem Lichtmikroskop (Orthoplan, Leitz, Deutschland) bei 250facher Vergrößerung betrachtet. Dieses ist an eine Kamera (DFC 230, Leica, Deutschland) gekoppelt, welche die Bilder auf einem Monitor anzeigt. Vor jeder Untersuchung wurde ein Objektmikrometer (Zeiss, Deutschland) für die Kalibrierung unter derselben Vergrößerung fotografiert. Nun wurden Fotografien der einzelnen Glomerulumanschnittsprofile erstellt. Waren auf dem Anschnitt einer Nierenlokalisierung beispielsweise drei Glomerulumprofile zu sehen, wurden Fotografien dieser drei Glomerulumprofile (G1, G2 und G3) auf den unterschiedlichen Schnittebenen erstellt, z.B. auf Schnitt 2, 5 und 8, sodass bei diesem Beispiel neun Bilder gespeichert werden konnten – drei pro Glomerulumprofil. Danach wurden die Fotografien sortiert, wobei stets dieselben Glomerulumprofile einander zugeordnet wurden, sodass von einem Glomerulumprofil jeweils drei Schnittebenen vorlagen (im Beispiel: G1 auf Schnitt 2, G1 auf Schnitt 5 und G1 auf Schnitt 8; ebenso bei G2 und G3).

Die Photographien sowie der Kalibrierungsmaßstab wurden alle in derselben Bildgröße ausgedruckt und die Fläche der Glomerulumschnittsprofile mithilfe des Videoplan Bildanalyse-Systems (Zeiss-Kontron, Deutschland) gemessen. Bei jedem Glomerulum wurden hierfür die Konturen aller drei Anschnittsprofile mit einem Cursor umfahren und mittels der Analysesoftware der jeweilige Flächenwert berechnet.

Das arithmetische Mittel der Flächenwerte des Glomerulumprofils errechnete sich durch Summation der drei Flächenwerte und anschließender Division durch die Anzahl der Schnittebenen (= 3).

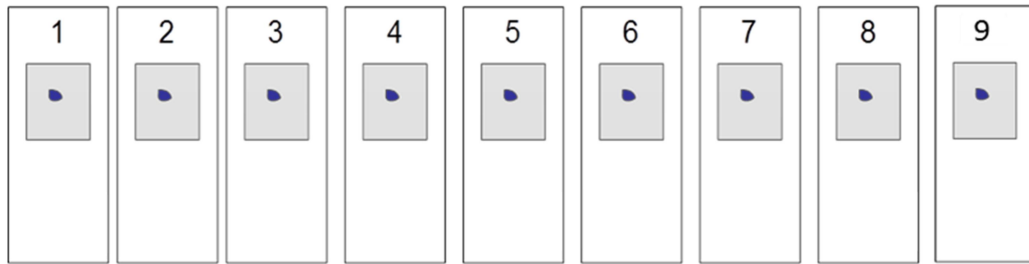
Nun wurden die Bilder der Glomerulumschnittsprofile eines Glomerulums miteinander verglichen und alle Zellkernprofile ( $Q^-$ ) (unterteilt in P und E+M) gezählt, die im ersten Schnitt (= Referenzschnitt) auftauchten, im Folgeschnitt jedoch nicht ( $Q^-_{(Z)}$ ,  $Q^-_{(P)}$ ,  $Q^-_{(E+M)}$ ). Nach Abschluss der Zählung wurden nun die Schnitte vertauscht, sodass der Folgeschnitt zum Referenzschnitt wurde und der Referenzschnitt zum Folgeschnitt. Durch Wiederholung der Auszählung konnte die Effizienz um den Faktor 2 gesteigert werden.

Folgendes Beispiel zeigt den Ablauf der Auswertung:

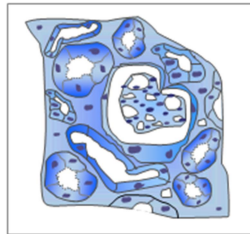
Zunächst wurde das Bild des Glomerulumprofils 1 auf Schnitt 2 mit dem Bild des Glomerulumprofils 1 auf Schnitt 5 verglichen. Alle Zellkernprofile, die auf Schnitt 2, jedoch nicht auf Schnitt 5 vorhanden waren, wurden gezählt ( $Q^-$ ). Nun erfolgte der Austausch des Referenz- und Folgeschnitts und eine erneute Auszählung nach dem gleichen Prinzip. Alle Zellkernprofile, die auf Schnitt 5 vorhanden waren, nicht jedoch auf Schnitt 2 wurden gewertet (siehe Abbildung 2).

## Schematische Darstellung der stereologischen Schätzung der Anzahl der Zellen im Glomerulum mit dem physikalischen Disektor Prinzip

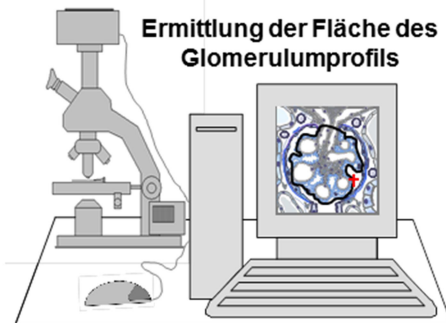
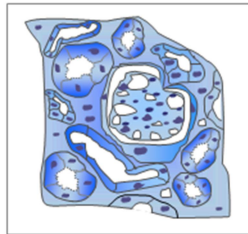
### A Neun Serienschritte (Semidünnschnitte, Schnittdicke 0,5 $\mu\text{m}$ )



### B Referenzschnitt

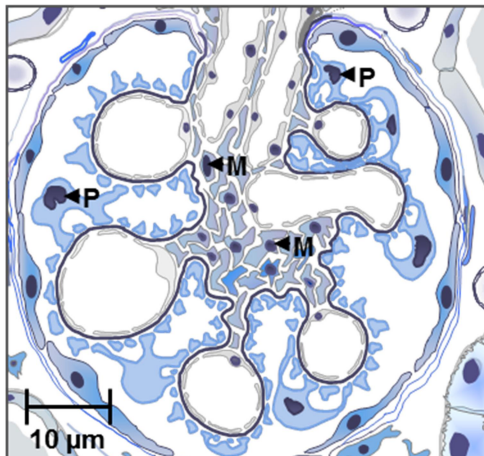


### Folgeschnitt

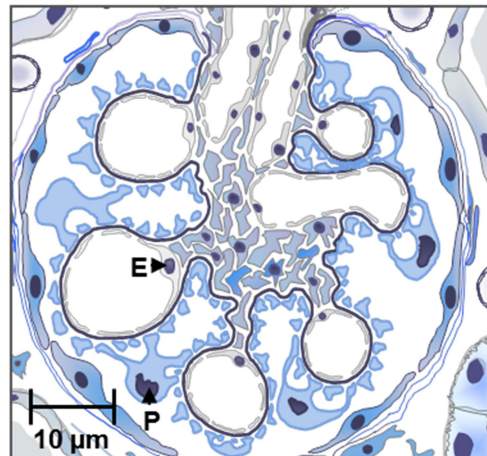


### C Fotografie der jeweiligen Glomerulumprofile im Referenzschnitt und im Folgeschnitt

#### Referenzschnitt



#### Folgeschnitt



Um die Effizienz des Disektors zu erhöhen wurde die Auszählung der Zellkerne in umgekehrter Richtung wiederholt. Hierfür wurde ein Schnitt als Referenzschnitt verwendet und der zweite als Folgeschnitt. Im zweiten Durchgang wurden die Schnitte vertauscht, sodass der Folgeschnitt zum Referenzschnitt und der Referenzschnitt zum Folgeschnitt wurde. (Q): P: Podozytenzellkern; M: Zellkern einer Mesangiumzelle; E: Zellkern einer Endothelzelle.

**Abbildung 2: Schematische Darstellung der stereologischen Schätzung der Anzahl der Zellen im Glomerulum mit dem physikalischen Disektor Prinzip.** A: Zwei Semidünnschnitte (hier Schnitt 2 und Schnitt 5) der neun Serienschritte mit einem definierten Abstand von 1,5  $\mu\text{m}$  werden ausgewählt (Referenzschnitt und Folgeschnitt = Disektoren; Disektorhöhe  $h = 1,5 \mu\text{m}$ ). Auf beiden Schnitten ist

das Anschnittsprofil eines identischen Glomerulums (G1) zu sehen. B: Die Flächenwerte der Anschnittsprofile des Glomerulums auf dem Referenzschnitt und dem Folgeschnitt werden ermittelt und das arithmetische Mittel der Flächenwerte als Disektorfläche verwendet. C: Zählung der Zellkerne, die im Referenzschnitt zu sehen sind, nicht jedoch im Folgeschnitt und umgekehrt. Abbildung modifiziert nach Blutke (2007).

Pro Tier wurden dabei durchschnittlich  $720 \pm 237$  Zellkernprofile ( $Q_{(Z)}^-$ ) gezählt.

Die numerische Dichte der glomerulären Zellen wurde nach folgender Gleichung berechnet (Sterio 1984, Wanke 1996, Blutke 2016):

$$\hat{N}_{V(\text{Zellen/Glom})(s)} = \frac{\sum_{i=1}^n Q_{(Z)i}^-}{h \cdot \sum_{i=1}^n a_{(\text{Glom})i}}$$

$\hat{N}_{V(\text{Zellen/Glom})(s)}$  = stereologischer Schätzwert für die numerische Dichte aller Zellen (Zellkerne) im Glomerulum (bezogen auf in Epon eingebettetes Gewebe) (Gesamtzellen, Zellen = Z; Podozyten, Zellen = P; Endothel- und Mesangiumzellen, Zellen = E + M)

$Q_{(Z)i}^-$  = Anzahl der im i-ten Disektor gezählten Zellkerne

h = Disektorhöhe (Abstand zwischen den ausgewählten Schnittpaaren, hier 1,5 µm)

$a_{(\text{Glom})i}$  = Flächeninhalt des i-ten Glomerulumprofils

n = Anzahl der pro Fall ausgewerteten Disektoren

Um die Gewebeschrumpfung von Gewebe während der Einbettung zu berücksichtigen, wurden die Werte mit dem Schrumpfungsfaktor für in Epon eingebettetes Schweinenierengewebe ( $f_s = 0,822$ ) korrigiert (Ermittlung des Schrumpfungsfaktors: siehe 3.4.8).

$$\hat{N}_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})} = \hat{N}_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})(s)} \cdot f_s^3$$

$\hat{N}_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})}$  = stereologischer Schätzwert für die numerische Dichte der Zellen (Zellkerne) im Glomerulum (vor Einbettung) (Gesamtzellen, Zellen = Z; Podozyten, Zellen = P; Endothel- und Mesangiumzellen, Zellen = E + M)

$\hat{N}_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})(s)}$  = stereologischer Schätzwert für die numerische Dichte der Zellen (Zellkerne) im Glomerulum (bezogen auf in Epon eingebettetes Gewebe) (Gesamtzellen, Zellen = Z; Podozyten, Zellen = P; Endothel- und Mesangiumzellen, Zellen = E + M)

$f_s$  = linearer Gewebeschrumpfungskorrekturfaktor für in Epon eingebettetes Schweinenierengewebe

Die Anzahl der Zellen pro Glomerulum ( $N_{(\text{Zellen}, \text{Glom})}$ ) errechnete sich aus dem Produkt der numerischen Dichte ( $N_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})}$ ) der Zellen im Glomerulum und dem mittleren Glomerulumvolumen ( $\bar{V}_{(\text{Glom})}$ ) (Weibel 1979, Wanke 1996).

$$\hat{N}_{(\text{Zellen}, \text{Glom})} = \hat{\bar{V}}_{(\text{Glom})} \cdot \hat{N}_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})}$$

$\hat{N}_{(\text{Zellen}, \text{Glom})}$  = stereologischer Schätzwert für die Anzahl der Zellen pro Glomerulum (Gesamtzellen, Zellen = Z; Podozyten, Zellen = P; Endothel- und Mesangiumzellen, Zellen = E + M)

$\hat{N}_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})}$  = stereologischer Schätzwert für die numerische Dichte der Zellen (Zellkerne) im Glomerulum (vor Einbettung) (Gesamtzellen, Zellen = Z; Podozyten, Zellen = P; Endothel- und Mesangiumzellen, Zellen = E + M)

$\hat{\bar{V}}_{(\text{Glom})}$  = stereologischer Schätzwert für das mittlere Glomerulumvolumen

### **3.4.13 Bestimmung des minimalen mittleren Durchmessers von porzinen Podozytenkernanschnittsprofilen**

Der minimale mittlere Durchmesser der Podozytenkernanschnittsprofile wurde zur Bestimmung der Disektorhöhe bei der Anwendung des Disektor-Prinzips (zur Schätzung der Anzahl und der numerischen Dichte glomerulärer Zellen im

Glomerulum) (siehe 3.4.13) ermittelt. Die Disektorhöhe entspricht ca. einem Drittel des minimalen mittleren Durchmessers der Podozytenkernprofile (Sterio 1984).

Sechs Tiere (drei transgene und drei Kontrolltiere) wurden mithilfe des Zufallszahlengenerators (Lang 2016) ausgewählt. Je Tier wurden drei in GMA/MMA eingebettete Nierenkortexpuben ebenfalls unter Anwendung des Zufallszahlengenerators für die Auswertung bestimmt und HE gefärbte Gewebeschnitte der ausgewählten Nierenlokalisationen angefertigt (siehe 3.4.5.1).

Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Orthoplan; Leitz, Deutschland), gekoppelt an eine Kamera (CCTV WV-CD123E; Matsushita, Japan) bei 40facher Vergrößerung mäanderförmig durchmustert und jedes zehnte Glomerulum ausgewertet. Die zur Auswertung systematisch zufällig ermittelten Glomerula wurden im gleichen Arbeitsschritt bei 250facher Vergrößerung betrachtet und alle eindeutig erkennbaren Podozytenkernanschnitte vermessen. Hierfür wurde das Videoplan Bildanalyse-System (Zeiss-Kontron, Deutschland) verwendet, welches durch Umfahren der Zellkernkonturen mit einem Cursor den minimalen Durchmesser des Zellkernanschnittsprofils errechnete.

#### **3.4.14 Bestimmung der Volumendichte der Podozyten ( $V_{V(\text{Pod}/\text{Glom})}$ ) und des Gesamtpodozytenvolumens ( $V_{(\text{Pod}, \text{Glom})}$ ) im Glomerulum sowie des mittleren Podozytenvolumens ( $\bar{V}_{(\text{Pod})}$ )**

Um die Volumendichte der Podozyten in einem Glomerulum zu ermitteln, wurden pro Tier sechs zufällig bestimmte (Zufallszahlengenerator (Lang 2016)) Glomerula ausgewertet. Hierzu wurden die Fotografien der Glomerulumschnitte, die für die Disektorauswertung gemacht wurden, verwendet.

Ein Punktraster mit 576 Punkten pro Gesichtsfeld wurde jeweils über die Bilder der einzelnen Glomerulumschnitte gelegt und alle Punkte gezählt, die das



Glomerulumprofil trafen. Außerdem wurden alle Punkte gezählt, die Podozytenprofile trafen.

Die Berechnung der Volumendichte der Podozyten im Glomerulum erfolgte durch Division der Summe der Punkte, die Podozytenprofile trafen, durch die Summe der Punkte, die die Glomerulumprofile trafen.

$$\hat{V}_{V(\text{Pod}/\text{Glom})} = A_{A(\text{Pod}/\text{Glom})} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Pt}_{(\text{Pod})i}}{\sum_{i=1}^n \text{Pt}_{(\text{Glom})i}}$$

$\hat{V}_{V(\text{Pod}/\text{Glom})}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte der Podozyten im Glomerulum

$A_{A(\text{Pod}/\text{Glom})}$  = Flächenanteil der Podozyten am Glomerulumanschnittsprofil

$\text{Pt}_{(\text{Pod})i}$  = Punkte, die Podozyten treffen im i-ten Schnittpräparat

$\text{Pt}_{(\text{Glom})i}$  = Punkte, die Glomerulumprofile treffen im i-ten Schnittpräparat

$n$  = Anzahl der Schnittpräparate

Des Weiteren wurde das Volumen der Podozyten im Glomerulum sowie das mittlere Podozytenvolumen bestimmt.

$$\hat{V}_{(\text{Pod, Glom})} = \hat{V}_{(\text{Glom})} \cdot \hat{V}_{V(\text{Pod}/\text{Glom})}$$

$\hat{V}_{(\text{Pod, Glom})}$  = stereologischer Schätzwert des gesamten Volumens der Podozyten im Glomerulum

$\hat{V}_{(\text{Glom})}$  = stereologischer Schätzwert für das mittlere Glomerulumvolumen

$\hat{V}_{V(\text{Pod}/\text{Glom})}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte der Podozyten im Glomerulum

$$\hat{\hat{V}}_{(\text{Pod})} = \frac{\hat{V}_{(\text{Pod, Glom})}}{\hat{N}_{(\text{Pod, Glom})}}$$

$\hat{\hat{V}}_{(\text{Pod})}$  = stereologischer Schätzwert für das mittlere Podozytenvolumen

$\hat{V}_{(\text{Pod, Glom})}$  = stereologischer Schätzwert des gesamten Volumens der Podozyten im Glomerulum

$\hat{N}_{(\text{Pod, Glom})}$  = stereologischer Schätzwert der Anzahl der Podozyten pro Glomerulum

### **3.4.15 Anfertigung und Kontrastierung von Ultradünnschnitten für die Auswertung am Transmissionselektronenmikroskop (TEM)**

Nach der Auswertung und Beurteilung der Semidünnschnitte wurden bei jedem Tier von jeweils drei Nierenlokalisationen Bereiche, die möglichst zwei Glomerula enthielten, für das Anfertigen der Ultradünnschnitte ausgewählt.

Die entsprechenden in Epon eingebetteten Nierenproben wurden daraufhin erneut getrimmt (Ultratrim, Reichert und Jung, Leica, Deutschland) und am Ultramikrotom geschnitten (Ultracut E, Reichert und Jung, Leica, Deutschland). Die erhaltenen 70 nm normaldicken Ultradünnschnitte wurden auf Formvar-Karbonfilm beschichtete Kupfer-Grids aufgezogen und für 30 Minuten mit 2%igem Uranylacetat kontrastiert. Die Schnitte wurden dann mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet. Nun erfolgte die zweite Kontrastierung mit Bleicitrat für 10 Minuten und anschließend nochmals eine Waschung und Trocknung.

Verwendete Chemikalien:

#### **2%iges Uranylacetat**

Uranylacetat (Agar Scientific, England)	1 g
Aqua bidest.	50 ml

## **Bleicitrat**

Lösung A, bestehend aus:		4 ml
Bleinitrat (Merck, Deutschland)	1,655 g	
Aqua bidest.	5 ml	
Lösung B, bestehend aus:		6 ml
Natriumcitrat (Merck, Deutschland)	2,94 g	
Aqua dest.	10 ml	
Lösung C, bestehend aus:		8 ml
Natriumhydroxid-Plätzchen (neoLab, Deutschland)	1 g	
Aqua bidest.	25 ml	
Aqua bidest.		32 ml

Für die Herstellung der Gebrauchslösung wurde zunächst Lösung B unter Rühren in Aqua bidest. gegeben, dann tropfenweise Lösung A hinzugegeben und zuletzt Lösung C untergerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert (Hartfilter, H602).

### **3.4.16 Bestimmung der Filtrationsschlitzfrequenz (FSF)**

Für die Bestimmung der Filtrationsschlitzfrequenz (FSF) wurden Ultradünnschnitte angefertigt (siehe 3.4.15). Die Ultradünnschnitte wurden mithilfe der Semidünnschnitte ausgewählt, die zur Ermittlung der Anzahl glomerulärer Zellen verwendet wurden. Pro Tier wurden drei Nierenlokalisationen untersucht. Bei jeder Nierenlokalisation wurde ein Bereich ausgewählt, auf dem zwei prominente Glomerulumanschnitte vorhanden waren. Somit konnten je Schwein sechs Glomerulumanschnittsprofile ausgewertet werden.

Für die weitere Analyse wurden die Schnitte unter einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 10/ CR, Zeiss, Deutschland) bei

10000facher Vergrößerung betrachtet und mit einer an das Elektronenmikroskop gekoppelten Digitalkamera (TRS SharpEye, Slow-scan 2k CCD Kamera, Moorenweis, Deutschland) abfotografiert. Dabei wurden pro Glomerulumprofil sechs bis acht Bilder der peripheren Kapillarschlingen aufgenommen. Die Auswahl der Bilder erfolgte systematisch zufällig. Hierzu wurde jedes Glomerulumprofil peripher umfahren und jeder sechste Bildausschnitt abfotografiert, angefangen bei einer Zufallszahl (Zufallszahlengenerator (Lang 2016)) zwischen eins und sechs (Blutke 2007).

Zusätzlich wurde für die spätere Kalibrierung ein Standard-Kreuzgitter (S 107, TAAB; USA) mit 2160 Linien/mm (entsprechend 2,160 Linien/ $\mu\text{m}$ ) in der jeweiligen Vergrößerung mitfotografiert.

Die Fotos wurden schließlich in einer finalen Vergrößerung von 26676 (Berechnung siehe Anhang 9.4) ausgedruckt und ausgewertet. Hierzu wurden alle Filtrationsschlitze auf einem Bild zwischen den podozytären Fußfortsätzen gezählt und die Länge der angrenzenden Basalmembran der Kapillarschlinge unter Verwendung des Videoplan Bildanalyse-Systems (Zeiss-Kontron, Deutschland) gemessen (siehe Abbildung 3). Je Schwein wurden durchschnittlich  $881 \pm 153$  Filtrationsschlitze gezählt.

Die Berechnung der FSF erfolgte nach folgender Formel (Remuzzi et al. 1995, Jani et al. 2002):

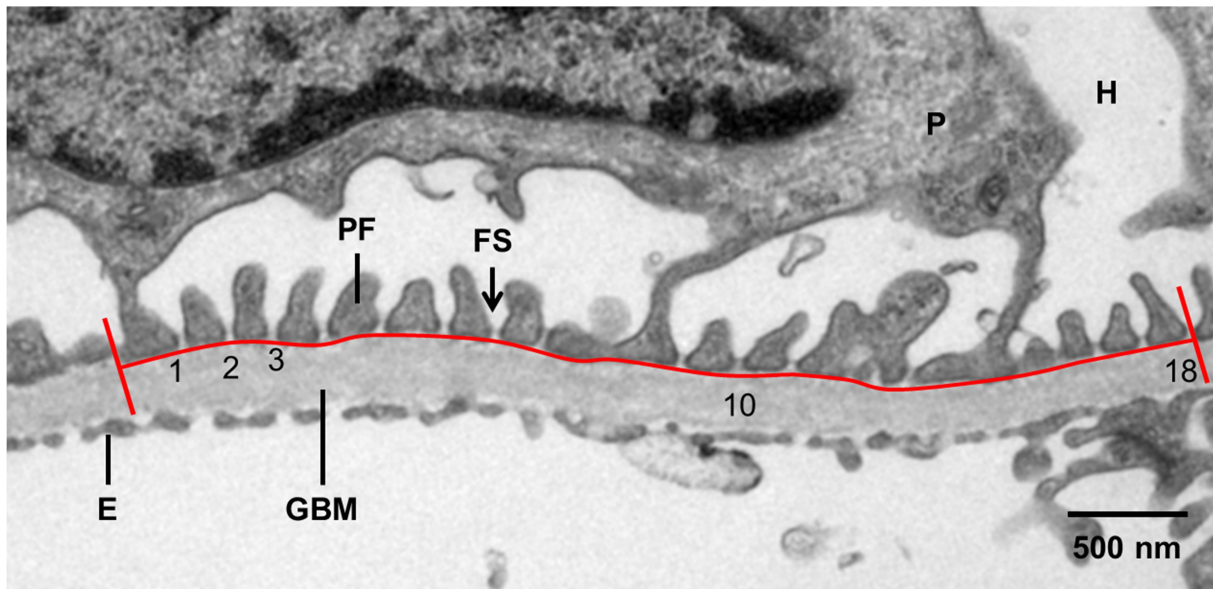
$$\text{FSF}(n_{(\text{FS})})/\mu\text{m} = \frac{\sum_{i=1}^n (N_{(\text{FS})i} - 1)}{\sum_{i=1}^n l_i}$$

$\text{FSF}(n_{(\text{FS})})/\mu\text{m}$  = Filtrationsschlitzfrequenz pro  $\mu\text{m}$  GBM

$N_{(\text{FS})i}$  = Anzahl der Filtrationsschlitze je Kapillarschlingenabschnitt im i-ten Bild

$l_i$  = Längenwert des Kapillarschlingenabschnitts in  $\mu\text{m}$  im i-ten Bild

n = Anzahl der Bilder



**Abbildung 3: Demonstration der Ermittlung der Filtrationsschlitzfrequenz** (TEM, 10000x). E: Endothelzelle. GBM: glomeruläre Basalmembran. PF: podozytärer Fußfortsatz. FS: Filtrationsschlitz. P: Podozyt. H: Harnraum. **—**: gemessene Länge der GBM zwischen dem ersten und letzten Filtrationsschlitz. Die Anzahl der Filtrationsschlitze (18 auf diesem Bild) pro gemessene Länge der GBM wird ermittelt. Abbildung in Anlehnung an Blutke (2007).

### 3.4.17 Ermittlung der wahren harmonischen mittleren Dicke der glomerulären Basalmembran ( $T_{h(GBM)}$ )

Die Ermittlung der Basalmembrandicke erfolgte an denselben Fotografien, die auch für die Bestimmung der FSF verwendet wurden. Dazu wurde die Methode des orthogonalen Achsenabschnitts verwendet (Jensen et al. 1979, Hirose et al. 1982, Dische 1992, Ramage et al. 2002).

Über die Bilder - aufgenommen bei 10000facher Vergrößerung und ausgedruckt mit einer finalen Vergrößerung von 26676 - wurde ein auf eine transparente Folie aufgedrucktes Gitter (2,5 x 2,5 cm) gelegt und alle Stellen markiert, an denen die Linien des Gitters die GBM trafen. An den markierten Stellen wurde anschließend die

Dicke der Basalmembran bestimmt, wobei immer die kürzeste Distanz von der Lamina rara interna (angrenzend ans Endothel) der GBM zur Lamina rara externa (angrenzend an die podozytären Fußfortsätze) ermittelt wurde (siehe Abbildung 5). Die Bestimmung der kürzesten Distanz erfolgte unter Verwendung einer auf eine transparente Folie aufgedruckten logarithmischen Messskala (siehe Abbildung 4), die von Ewald Freitag (Institut für Thermodynamik, TU München) nach den Vorgaben von Ramage et al. (2002) entwickelt und zur Verfügung gestellt wurde. Bei dieser Messskala wird 0,75 als Multiplikator des harmonischen (inversen) Wertes für jede Skaleneinteilung verwendet, wobei keine Bereiche der ermittelten GBM-Dicken in die erste Skaleneinteilung (bezeichnet als A) fallen dürfen.

Eine Tabelle der exakten Dimensionen der Messskala und ein Rechenbeispiel befinden sich im Anhang unter 9.3 und 9.4.

Für die Berechnung wurden folgende Formeln zugrunde gelegt:

$$\bar{I}_{h(GBM)} = \frac{\sum_{i=1}^n N_{(GBM-Dickebest.)i}}{\sum_{i=1}^n (MP \cdot N_{(GBM-Dickebest.)i})}$$

$\bar{I}_{h(GBM)}$  = scheinbare harmonische mittlere Dicke der GBM in mm

$N_{(GBM-Dickebest.)i}$  = Anzahl der Dickebestimmungen der GBM im i-ten Bild

MP = Mittelpunkte

n = Anzahl der Bilder

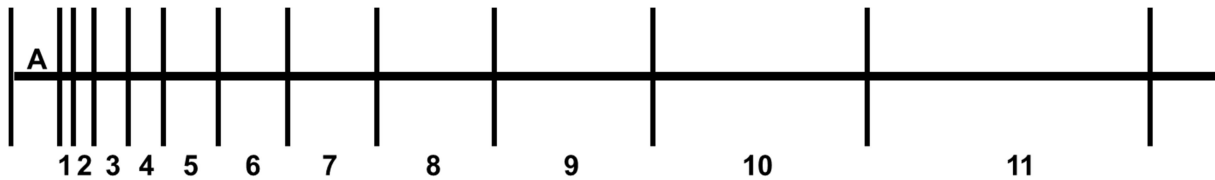
$$T_{h(GBM)} = \frac{8}{3 \cdot \pi} \cdot \frac{10^6}{M} \cdot \bar{I}_{h(GBM)}$$

$T_{h(GBM)}$  = wahre harmonische mittlere Dicke der GBM in nm

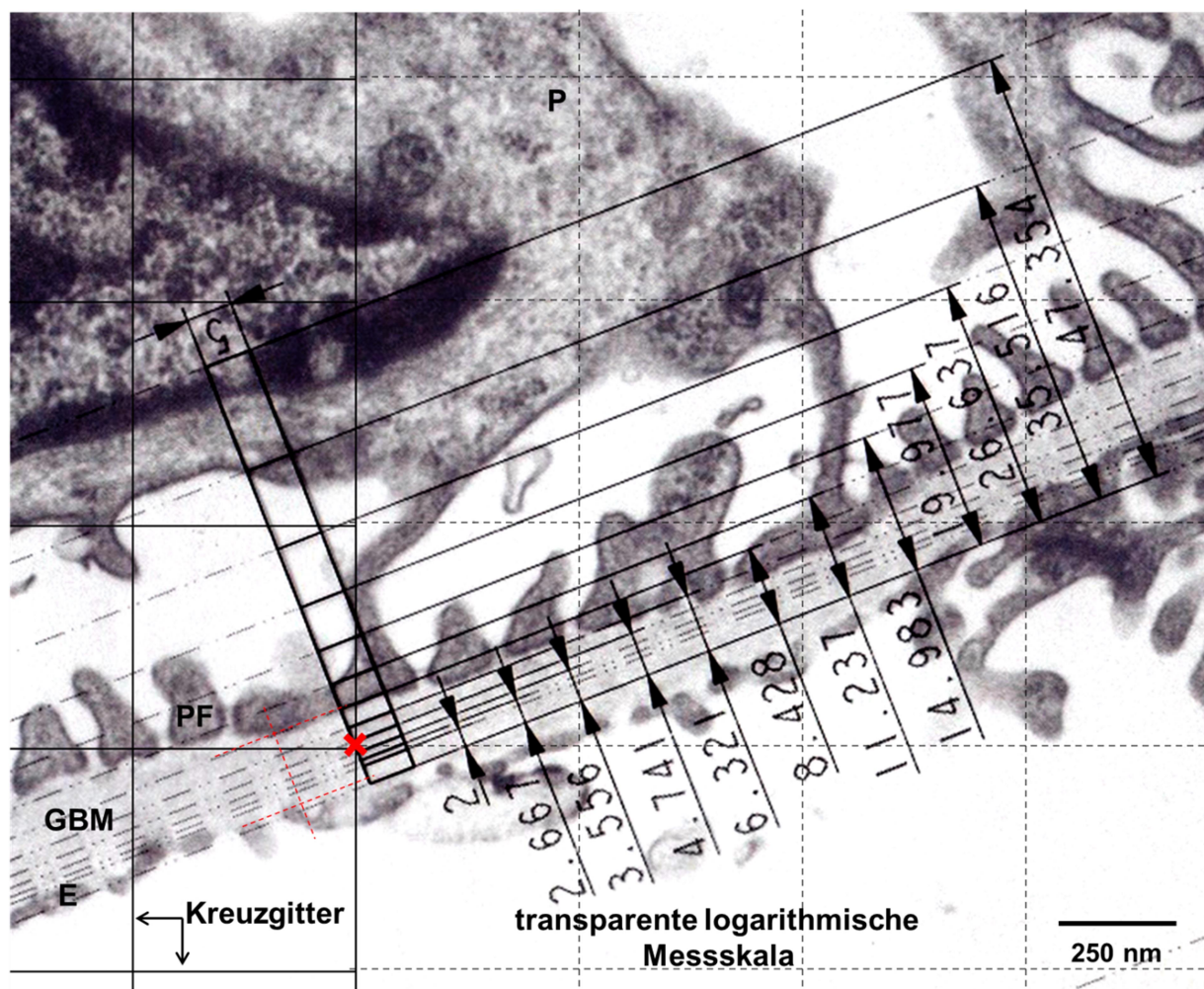
$\frac{8}{3 \cdot \pi} = 0,8488$  = Korrekturfaktor für schiefe Anschnitte der GBM

M = finaler Vergrößerungsfaktor der ausgedruckten Bilder (26676)

$\bar{I}_{h(GBM)}$  = scheinbare harmonische mittlere Dicke der GBM in mm



**Abbildung 4: logarithmische Messskala.** „A“ bezeichnet die erste Skaleneinteilung, in der keine ermittelten Werte der GBM-Dicke ausgewertet werden können. Die Einteilungen 1 bis 11 stellen Klassen dar, in denen die Bestimmung der GBM-Dicke durchgeführt wird. Abbildung in Anlehnung an Ramage et al. (2002).



**Abbildung 5: Demonstration der Messung der wahren harmonischen mittleren Basalmembrandicke (TEM, 10000x).** E: Endothelzelle. GBM: glomeruläre Basalmembran. PF: podozytärer Fußfortsatz. P: Podozyt. Das transparente Kreuzgitter (2,5 cm x 2,5 cm) wird über das elektronenmikroskopische Bild gelegt und die Schnittstellen mit der GBM gekennzeichnet. X: Schnittstelle des Kreuzgitters mit der GBM. Hier erfolgt die Messung des geringsten Abstandes der Lamina rara interna der GBM zur Lamina rara externa (rot gestrichelte Linie). Dafür wird eine

transparente logarithmische Messskala verwendet, die orthogonal an die GBM angelegt wird. Hier fällt der Messwert in Klasse 5 (A, 1, 2, 3, 4, 5, ...). Abbildung in Anlehnung an Blutke (2007).

### **3.5 Analyse der Urinproben**

#### **3.5.1 Harndichtemessung**

Die Harndichte wurde mithilfe eines Refraktometers (Müller Optronic, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde das Refraktometer mit destilliertem Wasser auf 0 g/ccm kalibriert und danach die Urinprobe aufgetragen. Der Dichtewert der Urinprobe konnte beim Blicken durch das Okular des Refraktometers abgelesen werden.

#### **3.5.2 Urinproteinanalyse durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Urinproben der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen diabetischen Schweine sowie der Kontrolltiere wurden am jeweiligen Sektionstag vor der Euthanasie der Tiere unter Allgemeinanästhesie mittels Zystozentese gewonnen und aliquotiert. Bis zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Für die Untersuchung des Urins auf das Auftreten einer Albuminurie wurde der Urin-Kreatiningehalt mittels automatischer Analysetechnik (Hitachi, Merck, Deutschland) bestimmt. Um eine einheitliche konstante Kreatininkonzentration von 10 mg/dl zu erhalten, wurden die Urinproben mit einem reduzierenden Probenpuffer verdünnt und standardisiert. Zusätzlich wurde bovines Serumalbumin (Sigma, Deutschland) als Standard 1:25 (5 µl bovines Serumalbumin mit 125 µl Puffer) mit dem Probenpuffer verdünnt. Danach wurden die Proben und das bovine Serumalbumin für 10 Minuten in einem Thermoblock (Biometra, Deutschland) auf 95°C erhitzt und denaturiert.

Ein zwölfprozentiges SDS-Polyacrylamid-Trenngel wurde vorbereitet und in den Zwischenraum zweier Glasplatten ausgegossen, eingespannt in eine Mini-Protean 3



Gel-Casting Chamber (Biorad, Deutschland). Um ein Wellung des Gels zu vermeiden, wurde es mit Isopropanol überschichtet und für die Auspolymerisierung für 45 Minuten bei Raumtemperatur in der Kammer belassen. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol vorsichtig abgegossen und mehrmals mit Aqua dest. abgewaschen. Nun wurde ein fünfprozentiges SDS-Polyacrylamid-Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm mit 10 Zinken in das noch flüssige Sammelgel geschoben, um Taschen für die Probenapplikation zu formen. Auch das Sammelgel wurde für die Polymerisation 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Ablauf der 45 Minuten wurde der Kamm vorsichtig aus dem ausgehärteten Gel entfernt. Das Gel wurde mitsamt den Glasplatten in eine Elektrophoresekammer (Protean 3, Biorad, Deutschland) eingespannt und die Kammer wurde bis zur Oberkante mit Laufpuffer befüllt.

Nun wurden je 10 µl der vorbereiteten Urinproben (4 Urinproben pro Gel), 7,5 µl eines Proteingewichtmarkers (Broad Range, Biorad, Deutschland) sowie 10 µl des bovinen Serumalbumins als Standard in die Probentaschen appliziert und die Elektrophorese bei 100 Volt gestartet. Nach 15 Minuten wurde die Voltzahl auf 200 erhöht und nach weiteren 30 Minuten Laufzeit die Elektrophorese beendet.

Das Gel wurde vorsichtig von den Glasplatten entfernt, die Probentaschen mittels einer Rasierklinge abgetrennt und die Banden mittels Silberfärbung (siehe Kapitel 3.5.2.1) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde das noch feuchte Gel eingescannt (OfficeJet G55, Hewlett Packard, Deutschland) und danach unter Anwendung des Standardprotokolls des Dry Ease<sup>TM</sup> Mini-Gel Trocknungs-Systems (Novex, Deutschland) getrocknet (detaillierte Beschreibung in Kapitel 3.5.2.2).

Zur Detektion einer Albuminurie wurden die Intensitäten aller Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht des bovinen

Serumalbumins, ausgewertet und die Ergebnisse der transgenen Tiere mit denen der Kontrolltiere verglichen.

Die verwendeten Materialien für die SDS-PAGE-Analyse sind im Folgenden aufgeführt.

#### **Tris/HCL 0.5 M pH 6.8**

Trisbase (AppliChem, Deutschland)	6,075 g
Aqua dest.	100 ml
Einstellung des pH-Wertes mit 1N HCl	

#### **Probenpuffer Stocklösung**

Aqua dest.	4,8 ml
Tris/HCL 0.5 M pH 6.8	1,2 ml
Glyzerol (Merck, Deutschland)	1 ml
SDS 10% (Roth, Deutschland)	2 ml
Bromphenolblau 0,1% (Merck, Deutschland)	0,5 ml

#### **Reduzierender Probenpuffer**

$\beta$ Mercaptoethanol (Sigma, Deutschland)	25 $\mu$ l
Probenpuffer Stocklösung	475 $\mu$ l

#### **Tris/HCL 1,5 M pH 8,8**

Trisbase (AppliChem, Deutschland)	18,5 g
Aqua dest.	100 ml
Einstellung des pH-Wertes mit 1N HCl	

**SDS-12% Polyacrylamidgel**

Aqua dest.	3,5 ml
Tris/HCL 1.5 M pH 8,8	2,5 ml
SDS 10% (Roth, Deutschland)	100 µl
Acrylamid 30% (Roth, Deutschland)	4,0 ml
Ammoniumpersulfat 10% (Biorad, Deutschland)	50 µl
Tetraethylethylenediamin (TEMED) (Roth, Deutschland)	10 µl

**SDS-5% Polyacrylamid-Sammelgel**

Aqua dest.	3,05 ml
Tris/HCL 0.5 M pH 6,8	1,25 ml
SDS 10% (Roth, Deutschland)	50 µl
Acrylamid 30% (Roth, Deutschland)	0,65 ml
Ammoniumpersulfat 10% (Biorad, Deutschland)	50 µl
Tetraethylethylenediamin (TEMED) (Roth, Deutschland)	10 µl

**Laufpuffer Stocklösung**

Trisbase (Roth, Deutschland)	30,3 g
Glyzin (Merck, Deutschland)	144 g
Aqua dest.	1 l

**Laufpuffer Gebrauchslösung**

Laufpuffer Stocklösung	40 ml
SDS 10% (Roth, Deutschland)	4 ml
Aqua dest.	400 ml

### 3.5.2.1 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Alle folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Nach Entnahme der Gele aus der Gelelektrophoresekammer wurden sie für 60 Minuten in einer Fixierlösung inkubiert. Danach folgte eine dreimalige Waschung mit 50%igem Ethanol für jeweils 20 Minuten auf einem Taumelmischer (Heidolph, Deutschland).

Für die Vorbehandlung wurde eine Natriumthiosulfatlösung vorbereitet und die Gele darin 1 Minute geschwenkt. Die Vorbehandlungslösung wurde durch dreimaliges Schwenken der Gele in destilliertem Wasser für jeweils 20 Sekunden abgewaschen. Durch die Inkubation der Gele für 20 Minuten in einer Silbernitratlösung erfolgte deren Imprägnierung. Auch die Imprägnierlösung wurde mit destilliertem Wasser (2 x 20 Sekunden) abgewaschen. Nun wurden die Gele in die Entwicklungslösung gegeben und bis zum Sichtbarwerden der Banden in der Lösung belassen. Nach einem erneuten Waschgang (20 Sekunden in destilliertem Wasser) wurde die Stopplösung aufgetragen (für 20 Minuten), um die Entwicklung zu beenden.

Folgende Materialien wurden verwendet.

#### Fixierlösung

Ethanol 50%	500 ml
Essigsäure 12% (AppliChem, Deutschland)	120 ml
Formaldehyd 37%	0,5 ml
Aqua dest.	

#### Vorbehandlungslösung

Natriumthiosulfat (VWR, Deutschland)	0,05 g
--------------------------------------	--------

Aqua dest.	50 ml
------------	-------

### **Imprägnierlösung**

Silbernitrat	0,05 g
Aqua dest.	50 ml
Formaldehyd	35 µl

### **Entwicklungslösung**

Natriumthiosulfat	0,2 mg
Formaldehyd	50 µl
Aqua dest.	100 ml

### **Stopplösung**

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Serva Feinbiochemica, Deutschland) 0,1 N	1,48 g
Aqua dest.	40 ml

### **3.5.2.2 Trocknung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Zur Trocknung der Polyacrylamidgele wurde das DryEase™ Mini-Gel Trocknungs-System (DryEase Mini-Gel Trocknungsrahmen, DryEase Mini-Gel Trocknungsunterlage, DryEase Mini Zellophan und Gel-Dry Trocknungslösung, Novex, Deutschland) verwendet.

Zunächst wurden die Gele dreimal für je 2 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 15 bis 20 Minuten auf einem Taumelmischer (Heidolph, Deutschland) in die Trocknungslösung eingelegt. Zwischenzeitlich wurden

2 Zellophanblätter für 15 bis 20 Sekunden in derselben Trocknungslösung eingeweicht.

Ein Zellophanblatt wurde danach auf den Trocknungsrahmen aufgespannt. Nun wurde das Polyacrylamidgel in der Mitte des Zellophans platziert, das zweite Zellophanblatt aufgelegt und unter Vermeidung von Lufteinschlüssen glattgestrichen. Durch das Anbringen des Gegenstücks des Trocknungsrahmens mit Klammern an allen vier Seiten des Rahmens wurden die Zellophanblätter samt Polyacrylamidgel knitterfrei eingespannt und zum Trocknen für 12 bis 36 Stunden aufgestellt. Danach konnte das mit Zellophan ummantelte Gel aus dem Rahmen entfernt werden und das überschüssige Zellophan mittels einer handelsüblichen Schere abgeschnitten werden. Um eine Wellung des Gels zu vermeiden, wurde es nochmals für 2 Tage zwischen die Seiten eines Buches gelegt und danach zur weiteren Aufbewahrung in einer Kassette gelagert.

### **3.6 Morphologische Untersuchung des Nervus fibularis communis**

#### **3.6.1 Probengewinnung**

Die Untersuchungen erfolgten an Proben des Nervus fibularis communis (N. fib.). Die Proben wurden nach der Freipräparation des Nervs gewonnen. Dazu wurde von der linken Körperhälfte ein 5 cm langes Stück des Nervs unmittelbar vor seiner distalen Aufzweigung auf Höhe des Unterschenkels entnommen. 2 cm der Probe des Nervs wurden in 6,25%igem Glutaraldehyd (Serva, Deutschland) in PBS-Puffer (pH 7,4) fixiert und somit für die weitere Einbettung in Epon bzw. zur Herstellung von Nervenzupfpräparaten (Teasingpräparaten) vorbeireitet. Nach 48 Stunden wurde die Nervenprobe weiter bearbeitet. 5 Stücke von ca. 0,8 cm Länge wurden quer zur Längsachse des Nervenstücks abgeteilt. Für die Einbettung in Epon wurden die Nervenstücke nochmals zugeschnitten. Die erhaltenen Gewebewürfel von 0,1 x 0,1 x

0,1 cm wurden anschließend mit der Querschnittsfläche nach unten analog der Nierenproben (siehe 3.4.10) eingebettet, um Querschnitte des Nervs zu erhalten. Das restliche Nervengewebe wurde für die Anfertigung der Teasingpräparate verwendet (siehe 3.6.3).

Für die Paraffineinbettung wurde ein ebenfalls 2 cm langes Stück des N.fib. in Paraformaldehyd (VWR international, Deutschland) fixiert, und entsprechend 3.3.1 in Paraffin eingebettet. Vor der Paraffineinbettung wurde das Nervenstück nochmals quer zur Längsachse unterteilt.

Ein Nervenstück wurde danach für einen Längsschnitt, das andere für einen Querschnitt in der beschrifteten Gewebekapsel platziert.

### **3.6.2 Anfertigung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Paraffinschnitte des Nervus fibularis communis**

Pro Tier wurden jeweils sechs Paraffinschnitte des Nervus fibularis communis angefertigt. Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden mit einem Mikrotom (HM 315, Mikrom GmbH, Deutschland) geschnitten. Die 3 µm dicken Schnitte wurden anschließend auf mit Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Objektträger (Starfrost, Engelbrecht, Deutschland) aufgezogen. Die Trocknung erfolgte in einem Inkubator (Memmert, Deutschland) bei 37°C für 24 Stunden.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte wie bei 3.3.2. beschrieben.

### **3.6.3 Herstellung von Teasingpräparaten des Nervus fibularis communis**

Für die Herstellung von Nervenzupfpräparaten (Drogemüller et al. 2010) wurden die oben erwähnten Nervenstücke (siehe 3.6.1) von 0,8 cm Länge nochmals zugeschnitten, die Enden begradigt und in Waschpuffer nach Sørensen (siehe 3.4.10) überführt.

Nach dem Waschen in der Pufferlösung wurde diese mittels einer Pipette abgesaugt. Für die Schwärzung des Nervengewebes wurde die Nervenprobe mit 2%iger Osmiumtetroxidlösung (Chem Pur, Deutschland; siehe 3.5.10) bedeckt und zwei Stunden abgedunkelt bei Raumtemperatur gelagert.

Danach wurde die Osmiumtetroxidlösung ebenfalls mithilfe einer Pipette abgesaugt und die Nervenstücke dreimal mit dem Waschpuffer nach Sörensen gewaschen. Für die weitere Verarbeitung wurden die Proben im Waschpuffer belassen.

Die Vereinzelung der Nervenfasern erfolgte unter einer Stereolupe (Stemi DV4, Optech Microscopes, England) bei 15-20facher Vergrößerung unter der Verwendung von sehr feinen Pinzetten.

Hierzu wurde ein Nervenstück aus dem Waschpuffer entnommen und auf einen Objektträger (Engelbrecht, Deutschland) gelegt. Um das Austrocknen des Nervengewebes zu vermeiden, wurde ein Tropfen Glycerin (Roth, Deutschland) auf das Nervenstück gegeben.

Nun wurde anhaftendes Bindegewebe vorsichtig vom restlichen Nervengewebe entfernt und dieses mithilfe zweier sehr feiner Pinzetten in einzelne Nervenfaserbündel zerteilt.

Eine Hälfte der Nervenfaserbündel wurde nativ weitervereinzelte, die andere Hälfte zusätzlich mit Hämalun-Färbelösung (Merck, Deutschland) gefärbt, um ggf. vorhandene Entzündungszellen besser darzustellen.

Für die Färbung wurden die Nervenfaserbündel in eine kleine Plastischale (Roth, Deutschland) gelegt und mit einigen Tropfen Hämalun-Lösung bedeckt. Nach zwei Minuten bei Raumtemperatur wurden die Farbüberstände unter fließendem Leitungswasser abgewaschen und die Nervenfaserbündel zurück auf den Objektträger (Engelbrecht, Deutschland) verbracht.



Für die Darstellung einzelner Nervenfasern wurde ein zweiter Objektträger (Engelbrecht, Deutschland) direkt im Anschluss an den ersten unter die Stereolupe gelegt. Unter Verwendung der feinen Pinzetten wurden die Nervenfaserbündel weiter zerteilt, solange bis einzelne Nervenfasern vorlagen. Diese wurden nun vorsichtig auf den zweiten Objektträger aufgezogen, wobei alle Nervenfasern parallel an der Oberkante des Objektträgers zu liegen kamen. Nachdem ca. 30 native Nervenfasern und 30 gefärbte Fasern auf den Objektträger aufgebracht waren, wurde ein Deckgläschen (Menzel GmbH & Co KG, Deutschland) vorsichtig auf die Nervenproben aufgelegt, sodass die lange Kante des Deckgläschens ca. 3 mm über den Objektträger hinausragte. Auf die Kante zwischen Objektträger und Deckglas wurde dann Glycerin (Roth, Deutschland) aufgetragen und solange nachgefüllt, bis das Glycerin die komplette Fläche zwischen Objektträger und Deckglas ausgefüllt hatte. Die Versiegelung der Kanten erfolgte mittels Histokitt (Engelbrecht, Deutschland), das auf alle Kanten des Deckgläschens aufgebracht wurde.

### **3.6.4 Quantitativ-stereologische Analysen an Proben des Nervus**

#### **fibularis communis**

Für die Bestimmung der Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern ( $V_{V(\text{Myelin/NF})}$ ) und die Ermittlung der g-Ratio des Nervus fibularis communis wurden Semidünnschnitte der in Epon eingebetteten Nervenproben angefertigt (siehe 3.4.10) und mit Toluidinblau-Safranin gefärbt (siehe 3.4.11).

Pro Tier wurden jeweils zwei Nervenlokalisationen ausgewertet. Die im Querschnitt dargestellten Nerven wurden unter Verwendung des Videoplan Bildanalyse-Systems (Zeiss-Kontron, Deutschland), das an ein Lichtmikroskop (Orthoplan; Leitz, Deutschland) gekoppelt ist, bei 630facher Vergrößerung ausgewertet. An den mittels Kamera (CCTV WV-CD123E; Matsushita, Japan) auf den Farbmonitor übertragenen

Bildern wurden Flächenwerte von den Nervenfasern und deren Myelinscheiden bzw. die minimalen mittleren Durchmesser beider Komponenten bestimmt.

#### **3.6.4.1 Bestimmung der Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern ( $V_{V(\text{Myelin/NF})}$ )**

Jedes fünfte des im Farbmonitor erscheinenden Gesichtsfelds eines Nervenquerschnitts wurde analysiert. Bei jedem Tier wurden durchschnittlich  $108 \pm 30$  Nervenfasern ausgewertet. Um keine Nervenfaser doppelt auszuwerten, wurde ein Rahmen mit verbotenen und erlaubten Linien in jedes Gesichtsfeld eingeblendet. Alle Nervenfaserschnitte, die die obere und rechte Kante des Rahmens berührten, wurden für die Messung der morphologischen Parameter berücksichtigt, diejenigen, die die untere und linke Kante des Rahmens berührten wurden ausgeschlossen.

Die Bestimmung der Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern erfolgte über die Flächenmessung der beiden Anteile nach dem Prinzip von Delesse (Weibel 1979).

Nach Kalibrierung des Systems unter Verwendung des Objekt-Mikrometers (Zeiss, Deutschland) wurden zunächst die Nervenfaserschnitte mit einem an das Bildanalyse-System gekoppelten Cursor umfahren und in einem zweiten Schritt die Axonschnitte ohne Myelinscheide. Die erhaltenen Werte wurden sofort nach der Messung in eine Tabelle eingetragen und später ausgewertet.

Die Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern wurde wie folgt berechnet:

$$\hat{V}_{V(\text{Myelin/NF})} = A_{A(\text{Myelin/NF})} = \frac{\sum_{i=1}^n A_{(\text{Myelin})i}}{\sum_{i=1}^n A_{(\text{NF})i}}$$

$\hat{V}_{V(\text{Myelin/NF})}$  = stereologischer Schätzwert der Volumendichte des Myelinscheiden in den Nervenfasern

$A_{A(\text{Myelin/NF})}$  = Flächenanteil der Myelinscheiden an den Nervenfasern im i-ten Schnittpräparat

$A_{(\text{Myelin})i}$  = Flächenwert der Myelinscheiden im i-ten Schnittpräparat

$A_{(\text{NF})i}$  = Flächenwert der Nervenfasern im i-ten Schnittpräparat

n = Anzahl der Schnittpräparate

Der Flächenwert der Myelinscheide in der jeweiligen Nervenfaser wurde durch Subtraktion des Flächenwerts des Axons vom Flächenwert der Nervenfaser berechnet.

$$A_{(\text{Myelin})} = A_{(\text{NF})} - A_{(\text{Axon})}$$

$A_{(\text{Myelin})}$  = Flächenwert der Myelinscheide in einer Nervenfaser

$A_{(\text{NF})}$  = Flächenwert einer Nervenfaser

$A_{(\text{Axon})}$  = Flächenwert des Axons in einer Nervenfaser

### 3.6.4.2 Berechnung der g-Ratio nach Rushton

Die g-Ratio stellt einen Messwert für die Dicke der Myelinscheide im Verhältnis zur Dicke des Axons dar (Rushton 1951, Chomiak und Hu 2009, Ugrenovic et al. 2016). Für die Berechnung der g-Ratio wurden die minimalen mittleren Durchmesser der Nervenfaserschnitte sowie ihrer Axonschnitte ermittelt. Bei jedem Tier wurden durchschnittlich  $97 \pm 23$  Nervenfasern ausgewertet, wobei die zufällig-systematische Auswahl der Fasern wie in 3.6.4.1 beschrieben erfolgte. Wie bei der Flächenmessung der Nervenfaserkomponenten wurde das Bildanalyse-System zunächst mithilfe des Objektmikrometers (Zeiss, Deutschland) kalibriert.

Anschließend wurde jeder Nervenfaserschnitt mit dem Cursor umfahren und vom System der jeweilige minimale mittlere Durchmesser (Dmin) bestimmt. Nach Aufzeichnung des erhaltenen Wertes wurde das Axonprofil desselben Nervenfaserschnitts umfahren und ebenfalls der minimale mittlere Durchmesser ermittelt.

Die Berechnung des minimalen mittleren Durchmessers durch das Bildanalyse System erfolgt durch die Generierung von Tangenten (32 pro Messung), die an die Kontur der zweidimensionalen Schnittfläche angelegt werden. Der minimale mittlere Durchmesser wird dann durch die Messung der Abstände der Tangentenmittelpunkte zueinander bestimmt.

Durch Division der Summe aller minimalen mittleren Durchmesser der Axonschnitte durch die Summe aller minimalen mittleren Durchmesser der Nervenfaserschnitte wurde die g-Ratio berechnet.

$$g - \text{Ratio} = \frac{\sum_{i=1}^n D_{\min(\text{Axon})i}}{\sum_{i=1}^n D_{\min(\text{NF})i}}$$

$D_{\min(\text{Axon})i}$  = minimaler mittlerer Durchmesser der Axone im i-ten Schnittpräparat

$D_{\min(\text{NF})i}$  = minimaler mittlerer Durchmesser der Nervenfasern i-ten Schnittpräparat

n = Anzahl der Schnittpräparate

### **3.7 Morphologische Untersuchung ausgewählter Blutgefäße**

#### **3.7.1 Probengewinnung**

Bei der Sektion der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine, sowie der Kontrolltiere wurden pro Tier stets je zwei Proben eines ausgewählten Blutgefäßes entnommen und in Paraformaldehyd (VWR international, Deutschland) fixiert. Die Proben wurden als Querschnitt des jeweiligen Gefäßes in Paraffin eingebettet (siehe 3.3.1).

Für die Untersuchung auf Diabetes mellitus-bedingte morphologische Gefäßveränderungen wurden Proben von großkalibrigen Gefäßen (der Aorta thoracalis, der Arteria carotis, der Arteria coronaris sinistra und der Arteria coronaris dextra (linke und rechte Herzkranzarterie)) verwendet.

### **3.7.2 Anfertigung und Färbung der Paraffinschnitte**

Von den quer in Paraffin eingebetteten Gefäßproben wurden mit dem Mikrotom HM 315 (Mikrom GmbH, Deutschland) 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Danach wurden die Schnitte auf Objektträger (Engelbrecht, Deutschland) aufgezogen und in einem Inkubator (Memmert, Deutschland) bei 37°C für 24 Stunden getrocknet.

Für die spätere Auswertung wurden neben einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung verschiedene histologische Spezialfärbungen angefertigt.

#### **3.7.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Gefäßschnitte**

Zur Durchführung siehe 3.3.2.

#### **3.7.2.2 Pikrosirius-Rot-Färbung der Gefäßschnitte zur Darstellung von Kollagenfasern**

Die Pikrosirius-Rot-Färbung ist eine Bindegewebsfärbung, die zur Darstellung von Kollagenfasern verwendet wird. Diese heben sich nach Ablauf des Färbeverfahrens aufgrund ihrer roten Farbe vom restlichen Gewebe ab.

Die Färbung wurde mit einem Färbekit der Firma Bio-Optica (Italien) durchgeführt.

Nach Entparaffinierung der Gewebeschnitte in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) für 10 Minuten und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (100%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 70%iger Alkohol), wurden die Schnitte in destilliertes Wasser überführt.

Von dort wurden sie in eine Inkubationsbox gelegt und mit jeweils 10 Tropfen Reagenz A beträufelt. Nach einer Inkubationszeit von 50 Minuten wurde Reagenz A abgekippt und die Schnitte mit Reagenz B gespült (durch Auftragen von 20 Tropfen pro Objektträger). Nun wurden 10 Tropfen Reagenz C für 3 Minuten auf jeden Schnitt aufgeträufelt und nach Ablauf der Inkubationszeit für 3 Minuten unter Leitungswasser gebläut.

Zuletzt wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (70%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 100%iger Alkohol) wieder dehydriert und in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) überführt.

Das Eindecken mit Deckgläsern (Menzel GmbH & Co KG, Deutschland) erfolgte unter Verwendung von Histokit (Engelbrecht, Deutschland).

Reagenz A	Pikrosirius-Rot-Lösung
Reagenz B	Pufferlösung
Reagenz C	Mayer's Hämalaun-Lösung

### **3.7.2.3 Elastika-van-Gieson-Färbung (WEG) der Gefäßschnitte zur**

#### **Darstellung von elastischen Fasern in Gefäßwänden**

Die WEG-Färbung wurde mit einem Färbekit der Firma Diapath (Italien) durchgeführt. Die elastischen Fasern erscheinen nach Durchführung der Färbung in blau-violetter Farbe.

Wie in 3.7.2.2 beschrieben wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert und danach rehydriert und in destilliertes Wasser überführt.

Nun wurden jeweils 5 Tropfen Reagenz A auf die abgetropften Objektträger aufgetragen, zusammen mit 5 Tropfen Reagenz B. Nach 5 Minuten Einwirkzeit

wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gespült, für 5 Minuten mit 10 Tropfen Reagenz C überschichtet und erneut mit Aqua dest. gespült.

Zwischenzeitlich wurde eine Inkubationsbox mit feuchten Tüchern ausgelegt und die Objektträger nach dem Spülen in die Box gelegt. Als nächster Schritt wurden je Schnitt 10 Tropfen Reagenz D aufgeträufelt und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten mit Aqua dest. abgespült.

Anschließend wurde Reagenz E (je 10 Tropfen für 2 Minuten) aufgetragen und die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gewaschen. Danach wurden die Objektträger wieder in Aqua dest. überführt.

Reagenz F (je 5 Tropfen) wurde in einem weiteren Schritt zusammen mit Reagenz G (je 5 Tropfen) auf die Schnitte aufgeträufelt und nach 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser wieder abgewaschen.

Danach wurden 10 Tropfen Reagenz H für 10 Minuten auf die Schnitte gegeben und nach Ablauf der Inkubationszeit mit Aqua dest. abgespült.

Die Dehydrierung erfolgte durch Eintauchen der Objektträger in eine aufsteigende Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (70%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 100%iger Alkohol). Eingehängt in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) wurden die Schnitte zuletzt mit Histokit (Engelbrecht, Deutschland) eingedeckelt.

Reagenz A	Kaliumpermanganat-Lösung
Reagenz B	Saurer Aktivierungspuffer
Reagenz C	5%ige Oxalsäure
Reagenz D	Resorcin-Fuchsin-Lösung
Reagenz E	Saurer Aktivierungspuffer
Reagenz F	Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung A(alkoholische Hämatoxylin-

Lösung)

Reagenz G                                      Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung B (salzsaure  
Eisen(III)nitrat-Lösung)

Reagenz H                                      Pikrofuchsin-Lösung (Pikrinsäure-Säurefuchsin-Lösung)

#### **3.7.2.4 Von-Kossa-Färbung der Gefäßschnitte zur Darstellung von Kalziumablagerungen**

Die Von-Kossa-Färbung wird für die Darstellung von Kalkablagerungen in Geweben verwendet. Die Kalziumablagerungen erscheinen nach der Färbung in bräunlich-schwarzer Farbe.

Für die Von-Kossa-Färbung wurden die Paraffinschnitte zunächst für 10 Minuten in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) entparaffiniert und danach in absteigender Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (100%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 70%iger Alkohol) rehydriert.

Anschließend wurden die Schnitte für 60 Minuten in Silbernitratlösung überführt und im hellen Sonnenlicht platziert. Die Schwärzung wurde durch mikroskopische Sichtung nach Ablauf der Zeit überprüft. War die Schwärzung erfolgreich, wurden die Objektträger in Aqua dest. geschwenkt und das Silbernitrat abgespült. Nun wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Natriumthiosulfat gebleicht und anschließend 10 Minuten unter fließendem, kaltem Leitungswasser gewässert.

Für die Gegenfärbung wurde Kernechtrot verwendet, in dem die Schnitte 5 Minuten belassen wurden. Die Farbe wurde danach mit Aqua dest. abgespült.

Zuletzt wurden die Schnitte durch Eintauchen in eine aufsteigende Alkoholreihe (CLN GmbH, Deutschland) (70%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 100%iger Alkohol) wieder dehydriert und in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) überführt.



Das Aufbringen der Deckgläser (Menzel GmbH & Co KG, Deutschland) erfolgte mit Histokit (Engelbrecht, Deutschland).

Folgende Chemikalien wurden für den Färbevorgang verwendet:

**5%ige Silbernitratlösung:**

Silbernitrat (VWR, Deutschland)	25 g
Aqua dest.	500 ml

**5%ige Natriumthiosulfatlösung:**

Natriumthiosulfat (Merck, Deutschland)	25 g
Aqua dest.	500 ml

**0,1%iges Kernechtrot:**

Aluminiumsulfat (Merck, Deutschland)	50 g
Aqua dest.	1000 ml
Kernechtrot (Merck, Deutschland)	1 g

Für die Herstellung der Kernechtrotlösung wurde das destillierte Wasser erhitzt und die Feststoffe darin gelöst. Danach erfolgte eine Filtrierung der Lösung.

### **3.7.2.5 Masson-Trichrom-Färbung der Gefäßschnitte zur Darstellung von Bindegewebsstrukturen**

Die Masson-Trichrom-Färbung wird zur Darstellung von Bindegewebe und zur Unterscheidung von Muskelgewebe von Kollagenfasern verwendet. Zellkerne färben sich violett an, Zytoplasma rötlich und Kollagenfasern blau.

Für die Masson-Trichrom-Färbung wurden die entparaffinierten und rehydrierten (siehe 3.7.2.2) Gewebeschnitte zunächst für 5 Minuten in Weigert's Eisenhämatoxylinlösung eingehängt und danach 5 Minuten lang unter warmem

Leitungswasser gewässert. Die Differenzierung erfolgte durch Eintauchen in 0,5%igen HCL-Alkohol. Hierauf wurden die Schnitte erneut 5 Minuten lang warm gewässert. Nun wurden die Schnitte 15 Minuten lang in die „Rote Färbelösung“ überführt und danach zunächst mit Aqua dest. und anschließend mit 0,5%iger Essigsäure abgespült.

Für den zweiten Färbevorgang wurde Phosphorwolframsäure-Orange G verwendet, in der die Schnitte 3 Minuten lang inkubiert wurden. Auch hier wurden die Überschüsse der Färbelösung mit Aqua dest. und 0,5%iger Essigsäure abgespült.

Der letzte Färbeschritt wurde mit Anilinblau für 30 Sekunden durchgeführt. Das Entfernen der Überschüsse erfolgte wie bei den beiden ersten Schritten.

Die Dehydrierung der Schnitte und das Auftragen der Deckgläser (Menzel GmbH & Co KG, Deutschland) erfolgten wie in 3.7.2.2 beschrieben.

Verwendete Chemikalien:

### **Weigert's Eisenhämatoxylinlösung:**

Lösung A, bestehend aus:

Hämatoxylin, kristallisiert (Merck, Deutschland)	10 g
96%iger Alkohol (CLN GmbH, Deutschland)	1000 ml

Zum Lösen des kristallinen Hämatoxylins wurde die Lösung erwärmt. Nach Fertigstellung wurde die Lösung eine Woche zum Reifen stehen gelassen.

Lösung B, bestehend aus:

Eisenchlorid (Merck, Deutschland)	11,6 g
Aqua dest.	980 ml
25%ige Salzsäure (Roth, Deutschland)	10 ml

Lösung A und Lösung B wurden vor Gebrauch im Verhältnis 1: 1 gemischt.

**Rote Färbelösung:**

Lösung A, bestehend aus: 20 ml

Aqua dest. (kochend) 500 ml

Säurefuchsin (Rubin S) (Merck,  
Deutschland) 5 g

Eisessig (VWR, Deutschland) 5 ml

Lösung B, bestehend aus: 80 ml

Aqua dest. (kochend) 1000 ml

Xylidine Ponceau (RAL Diagnostics,  
Frankreich) 10 g

Eisessig (VWR, Deutschland) 10 ml

Azophloxinlösung, bestehend aus: 20 ml

Azophloxin (Chroma-Gesellschaft  
Schmid GmbH, Deutschland) 1,25 g

Aqua dest. 250 ml

Eisessig (VWR, Deutschland) 0,5 ml

Nach Mischen der Lösungen, wurden diese zusammen filtriert.

**Phosphorwolframsäure-Orange G:**

Wolframatphosphorsäure-Hydrat (Merck,  
Deutschland) 15 g

Orange G (Merck, Deutschland) 10 g

Aqua dest. 500 ml

**Anilinblau:**

Anilinblau (Merck, Deutschland)	10 g
Aqua dest.	1000 ml
Eisessig (VWR, Deutschland)	10 ml

**0,5%ige Essigsäure:**

Aqua dest.	10000 ml
Eisessig (VWR, Deutschland)	50 ml

**0,5%iger HCL-Alkohol:**

1%ige HCL-Alkohol-Stammlösung, bestehend	100 ml
--	--------

aus:

96%iger Alkohol (CLN GmbH, Deutschland)	7000 ml
Aqua dest.	2500 ml
25%ige Salzsäure (Roth, Deutschland)	1000 ml
70%iger Alkohol (CLN GmbH, Deutschland)	100 ml

**3.7.2.6 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) der Gefäßschnitte zur****Darstellung von kohlenhydrathaltigen Strukturen**

Mit der PAS Reaktion können kohlenhydrathaltige Strukturen wie Mukopolysaccharide, Glykogen, Glykoproteine und Glykolipide dargestellt werden. Mukopolysaccharide erscheinen in einem kräftigen Rot wohingegen Glykogen und Glykoproteine eher rosa angefärbt werden.

Für die PAS-Reaktion wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert (siehe 3.7.2.2). Die Oxidation der Gewebeschnitte erfolgte für 10 Minuten in

Perjodsäure. Diese wurde anschließend unter kaltem Leitungswasser 10 Minuten lang abgespült. Ein weiterer Spülgang wurde mit Aqua dest. durchgeführt.

Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten lang in Schiffsche Reagenz gegeben und dunkel, bei Raumtemperatur gelagert. Die Farbüberschüsse wurden 5 Minuten lang mit warmem Leitungswasser entfernt.

Zur Differenzierung wurden die Schnitte dreimal in 0,5%igen HCL-Alkohol eingetaucht und nochmals 5 Minuten warm gewässert. Nach Dehydrierung und Überführung in Xylol (SAV LP GmbH, Deutschland) (siehe 3.7.2.2), wurden die Schnitte unter Verwendung von Histokit (Engelbrecht, Deutschland) eingedeckelt.

Verwendete Chemikalien:

#### **1%ige Perjodsäure:**

Lösung A, bestehend aus:

Perjodsäure (Merck, Deutschland)	10 g
Aqua dest.	1000 ml

Lösung B, bestehend aus:

Natriumacetat (Merck, Deutschland)	1,6 g
Aqua dest.	100 ml

Die Lösungen wurden gemischt und im Kühlschrank aufbewahrt.

#### **Schiffsche Reagenz (Roth, Deutschland)**

#### **0,5%iger HCL-Alkohol:**

1%ige HCL-Alkohol-Stammlösung,	100 ml
--------------------------------	--------

bestehend aus:

96%iger Alkohol (CLN GmbH, Deutschland)	7000 ml
Aqua dest.	2500 ml
25%ige Salzsäure (Roth, Deutschland)	1000 ml
70%iger Alkohol (CLN GmbH, Deutschland)	100 ml

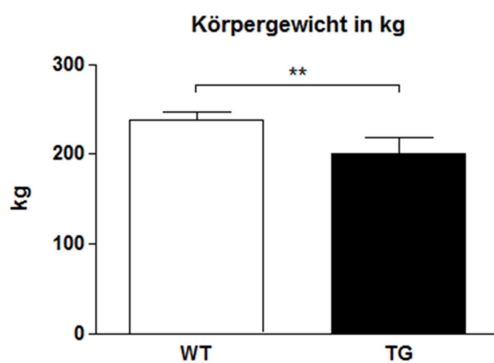
### **3.8 Statistik**

Alle Parameter werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung präsentiert. In den beiden Tiergruppen wurden die Mittelwerte der erhobenen Daten (WT vs. TG) mit einem unabhängigen zweiseitigen t-Test (MS Excel, Microsoft, USA) miteinander verglichen. Als Signifikanzniveau wurde 5% gewählt ( $p \leq 0,05$ ). Alle Grafiken wurden mithilfe der GraphPad Prism 3.0 Software (GraphPad Software Inc., USA) erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht unterschied sich signifikant zwischen den Wildtypkontrolltieren und den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen. Die transgenen Tiere wiesen eine Reduktion des Körpergewichts um 16% im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (WT vs. TG:  $238 \pm 9$  kg vs.  $200 \pm 18$  kg (Kontrolleber: 340 kg; transgener Eber: 226 kg)) (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Körpergewicht der Wildtypkontrolltiere und der  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweine.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. \*\*:  $p < 0,01$ .

### 4.2 Ergebnisse der Untersuchung des Pankreas

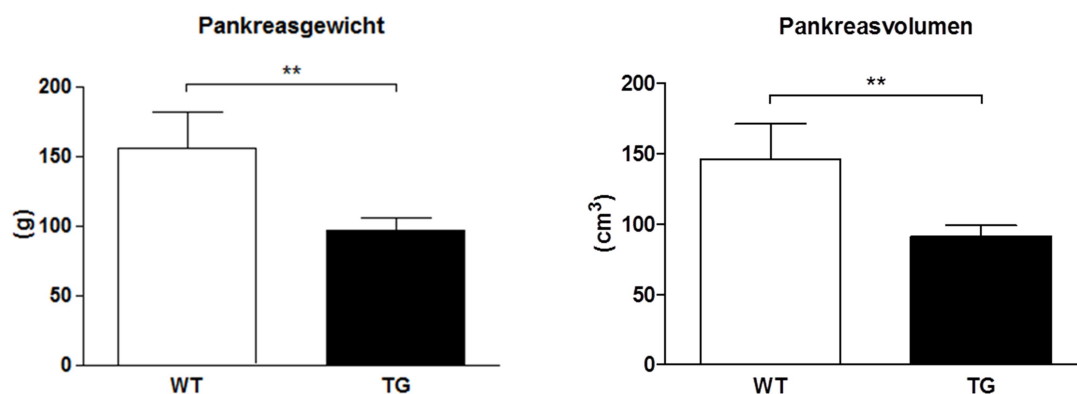
#### 4.2.1 Absolutes Pankreasgewicht, relatives Pankreasgewicht und Pankreasvolumen

Das Pankreasgewicht wurde nach der Organentnahme bei der Sektion in Gramm erhoben. Die zweijährigen  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweine zeigten eine signifikante Reduktion des absoluten Organgewichts um 28% im Vergleich zu den Kontrolltieren (mittleres Pankreasgewicht der Wildtypkontrolltiere:  $155 \pm 27$  g; mittleres Pankreasgewicht der transgenen Schweine:  $111 \pm 32$  g (Kontrolleber: 198 g; transgener Eber: 166 g)).

Das relative Organgewicht des Pankreas wurde im Verhältnis zum Körpergewicht (KGW) erhoben ( $\text{Gewicht}_{(\text{Pan})}/\text{KGW}$  in ‰). Das relative Pankreasgewicht war bei den zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren signifikant reduziert. Das relative mittlere Pankreasgewicht der Wildtypen betrug  $0,64\text{‰} \pm 0,14\text{‰}$ , das der transgenen Tiere  $0,51\text{‰} \pm 0,08\text{‰}$  (Kontrolleber:  $0,58\text{‰}$ ; transgener Eber:  $0,73\text{‰}$ ).

Entsprechend des Organgewichts zeigte sich auch hier eine signifikante Reduktion des Organvolumens bei den transgenen Tieren.

(WT vs. TG:  $146,14 \pm 25,08 \text{ cm}^3$  vs.  $91,34 \pm 7,80 \text{ cm}^3$  (Kontrolleber:  $186,44 \text{ cm}^3$ ; transgener Eber:  $156,31 \text{ cm}^3$ )) (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: absolutes Pankreasgewicht und Pankreasvolumen der Wildtypkontrolltiere sowie der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen weiblichen Schweine.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. \*\*:  $p < 0,01$ .

#### 4.2.2 Qualitativ-histologische Befunde der Pankreasuntersuchung

Die qualitativ-histologische Untersuchung wurde an Hämatoxylin-Eosin gefärbten Pankreasschnitten, sowie an immunhistochemisch behandelten Pankreasschnitten, bei denen die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen dargestellt wurden, durchgeführt.



Bei den nicht transgenen Kontrolltieren ließen sich Ausschnitte mit zahlreichen Langerhans'schen Inseln mit einem hohen Gehalt an insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen im Pankreasgewebe darstellen. Sie waren unterschiedlich groß und zeigten die für das Schwein typischen unterschiedlichen Formen von rund über oval bis hantelförmig (Ulrichs et al. 1994, Vantyghem et al. 1996).

Neben den Inselformationen fanden sich in den immunhistochemisch gefärbten Schnitten auch vereinzelt solitäre, isolierte  $\beta$ -Zellen.

Im Gegensatz dazu waren bei den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen keine im Hinblick auf Größe und Gestalt physiologisch proportionierten Langerhans'schen Inseln vorhanden. Lediglich vereinzelte  $\beta$ -Zellen ließen sich im Gewebe nach der immunhistochemischen Behandlung darstellen. Auch die Farbintensität der  $\beta$ -Zellen war merklich vermindert (siehe Abbildung 8).

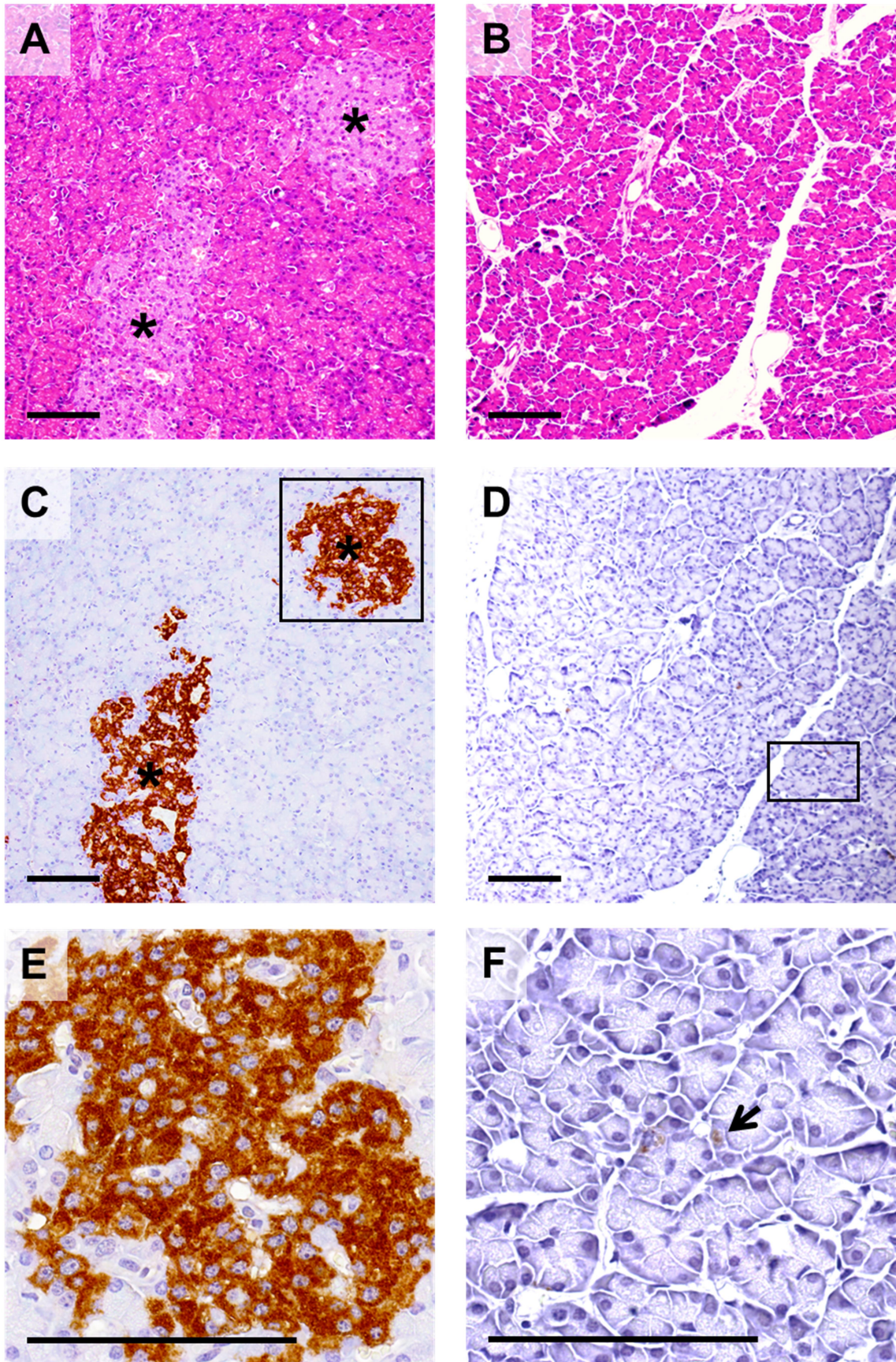


Abbildung 8: Repräsentative histologische Pankreasschnitte eines nicht transgenen weiblichen Wildtypkontrolltiers (A, C und E) und eines *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweins (B, D und

**F).** A und B: Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Gewebeschnitte. C-F: immunhistochemisch behandelte Folgeschnitte von A und B zur Darstellung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen (IHC). Maßstab: je 100  $\mu\text{m}$ . 100fache (A-D) bzw. 400fache (E und F) lichtmikroskopische Vergrößerung. A: Pankreasgewebe eines Kontrolltiers mit zwei Langerhans'schen Inseln (\*). B: Pankreasgewebe eines transgenen Schweins. Endokrines Pankreasgewebe ist im HE gefärbten Schnitt nicht zu erkennen. C und D: Folgeschnitte von A und B. Das mittels IHC dargestellte Insulin zeigt die Lokalisation der  $\beta$ -Zellen. E und F: Jeweils vergrößerter Ausschnitt aus C und D. Deutlich sind die  $\beta$ -Zellen innerhalb der Langerhans'schen Insel bei dem nicht transgenen Kontrolltier (E) zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind bei dem diabetischen transgenen Schwein nur vereinzelte, schwach dargestellte  $\beta$ -Zellen (Pfeil) zu erkennen (F).

#### 4.2.3 Ergebnisse der quantitativ-stereologischen Schätzung der

##### **Volumendichte der $\beta$ -Zellen im Pankreas ( $V_{V(\beta\text{-Zellen/Pan})}$ ) und der $\beta$ -**

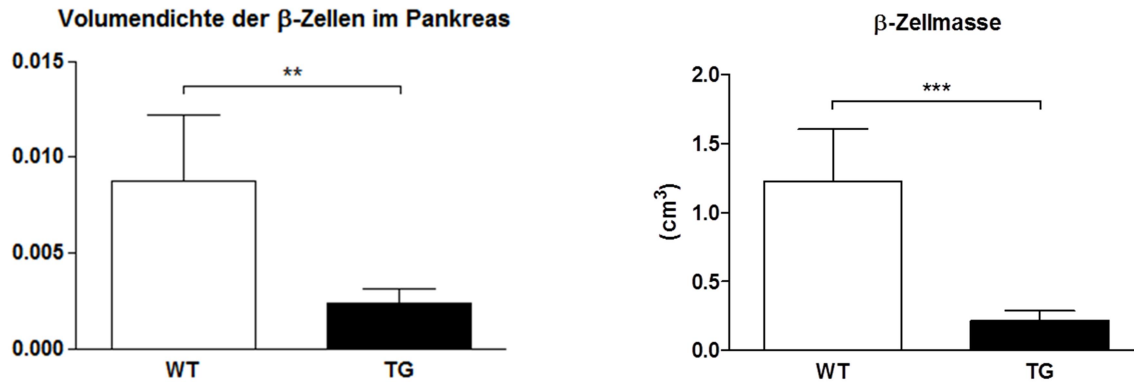
##### **Zellmasse ( $V_{(\beta\text{-Zellen, Pan})}$ )**

Die Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas war bei den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen um 72% signifikant reduziert (WT vs. TG:  $0,87\% \pm 0,34\%$  vs.  $0,24\% \pm 0,1\%$  (Kontrolleber:  $1,1\%$ ; transgener Eber:  $0,19\%$ )).

Auch das gesamte Volumen der  $\beta$ -Zellen im Pankreas ( $\beta$ -Zellmasse) war bei den transgenen Schweinen signifikant um 82% reduziert (Wildtypkontrolltiere:  $1,23 \pm 0,38 \text{ cm}^3$ , transgene Tiere:  $0,22 \pm 0,07 \text{ cm}^3$  (Kontrolleber:  $2,05 \text{ cm}^3$ ; transgener Eber:  $0,30 \text{ cm}^3$ )) (siehe Abbildung 9).

Das relative Volumen der  $\beta$ -Zellen in Bezug zum Körpergewicht ( $V_{(\beta\text{-Zellen, Pan})}/\text{KGW}$  ( $\text{cm}^3/\text{kg}$ )) war bei den transgenen weiblichen Tieren signifikant um 79% reduziert im Vergleich zu den nicht transgenen Wildtypkontrolltieren (WT vs. TG:  $0,0052 \pm 0,0017 \text{ cm}^3/\text{kg}$  vs.  $0,0011 \pm 0,0003 \text{ cm}^3/\text{kg}$  (Kontrolleber:  $0,006 \text{ cm}^3/\text{kg}$ ; transgener Eber:  $0,0013 \text{ cm}^3/\text{kg}$ )).





**Abbildung 9: Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas ( $V_{V(\beta\text{-Zellen/Pan})}$ ) und  $\beta$ -Zellmasse  $V_{(\beta\text{-Zellen, Pan})}$  der Wildtypkontrolltiere und der weiblichen  $INS^{C94Y}$  transgenen Tiere. WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. \*\*:  $p < 0,01$ . \*\*\*:  $p < 0,001$ .**

### 4.3 Ergebnisse der Untersuchung der Nieren

#### 4.3.1 Absolutes Nierengewicht, relatives Nierengewicht und

##### Nierenvolumen

Bei der Sektion der transgenen Schweine sowie der Kontrolltiere wurde die jeweils linke Niere zuerst entnommen und danach sofort mittels Fallstromperfusion fixiert. Die rechten Nieren der Tiere wurden dagegen nach ihrer Entnahme im Rohzustand gewogen.

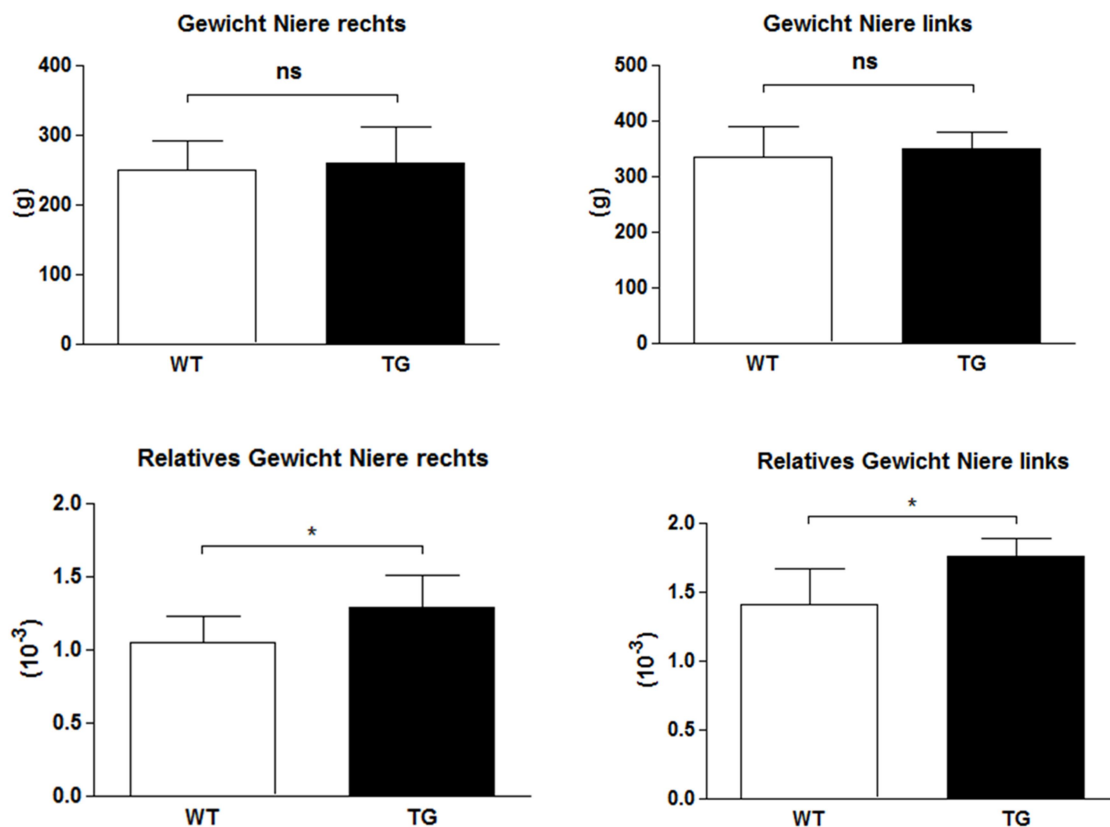
Die Ergebnisse der linken bzw. rechten Nieren werden daher getrennt dargestellt.

Die absoluten Gewichte der rechten Nieren und der linken Nieren zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtypkontrolltieren und den transgenen Tieren. (WT vs. TG: Niere rechts:  $250 \pm 42$  g vs.  $259 \pm 53$  g (Kontrolleber: 380 g; transgener Eber: 193 g); Niere links:  $335 \pm 55$  g vs.  $350 \pm 30$  g (Kontrolleber: 570 g; transgener Eber: 245 g)).

Das relative Gewicht der Nieren wurde im Verhältnis zum Körpergewicht ermittelt:

$\text{Gewicht}_{(\text{Niere rechts bzw. links})/\text{KGW}} \text{ (in \%)}.$

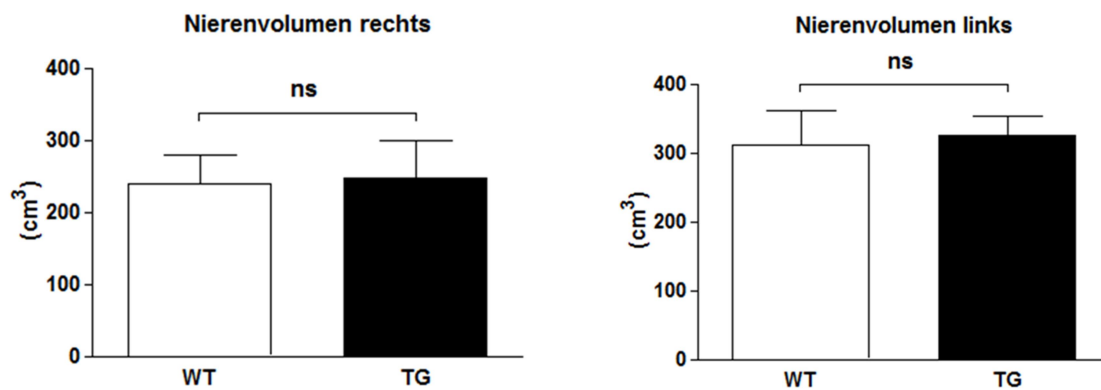
Das relative Gewicht der linken und rechten Nieren der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine war jeweils um 19% erhöht im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren (WT vs. TG: Niere rechts: 1,05‰ ± 0,18‰ vs. 1,29‰ ± 0,22‰ (Kontrolleber: 1,12‰; transgener Eber: 0,85‰); Niere links: 1,41‰ ± 0,26‰ vs. 1,75‰ ± 0,13‰ (Kontrolleber: 1,68‰; transgener Eber: 1,08‰)) (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Absolutes und relatives Nierengewicht der nicht perfusionsfixierten und perfusionsfixierten Nieren der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine und der Wildtypkontrolltiere.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. ns: nicht signifikant. \*:  $p < 0,05$ .

Das Nierenvolumen der rechten und linken Nieren zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen (WT vs. TG: Niere rechts: 239 ± 40 cm<sup>3</sup> vs. 248 ± 51 cm<sup>3</sup> (Kontrolleber: 364 cm<sup>3</sup>; transgener Eber: 185 cm<sup>3</sup>); Niere links:

$311 \pm 51 \text{ cm}^3$  vs.  $325 \pm 28 \text{ cm}^3$  (Kontrolleber:  $529 \text{ cm}^3$ ; transgener Eber:  $227 \text{ cm}^3$ ))  
(siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Nierenvolumen der nicht perfusionsfixierten und perfusionsfixierten Nieren der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine und der Kontrolltiere.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant.

#### 4.3.2 Qualitativ-histologische Untersuchungsbefunde der perfusionsfixierten Nieren

Die histologische Beurteilung des perfusionsfixierten Nierenrindengewebes wurde zum einen an Schnitten von in Kunststoff (GMA/MMA) eingebetteten Gewebeproben durchgeführt, zum anderen an in Epon eingebetteten, Toluidinblau-Safranin gefärbten Semidünnschnitten.

Die Kunststoffschnitte wurden verschiedenen histologischen Färbungen unterzogen: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, PAS-Reaktion und Versilberung nach Rambourg kombiniert mit der PAS-Reaktion (siehe 3.4.5).

Bei der histopathologischen Befundung wurden keine Alterationen gefunden, die typischerweise bei der diabetischen Nephropathie des Menschen auftreten (glomeruläre Hypertrophie, Verbreiterung bis hin zu knotiger Verdickung der Mesangiumfelder, Synechien der viszeralen und parietalen Blätter der Bowman-

Kapsel, Hyalinose, aneurysmatische Veränderungen der Kapillaren, noduläre Glomerulosklerose, Tubulusatrophie, interstitielle Fibrose (Helmchen et al. 2006, Amann et al. 2013, Hara et al. 2014)).

Bei den zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen weiblichen Schweinen sowie dem dreijährigen transgenen Eber konnten auf lichtmikroskopischer Ebene keine Dm-assozierten Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypen gefunden werden (siehe Abbildungen 12 und 13).



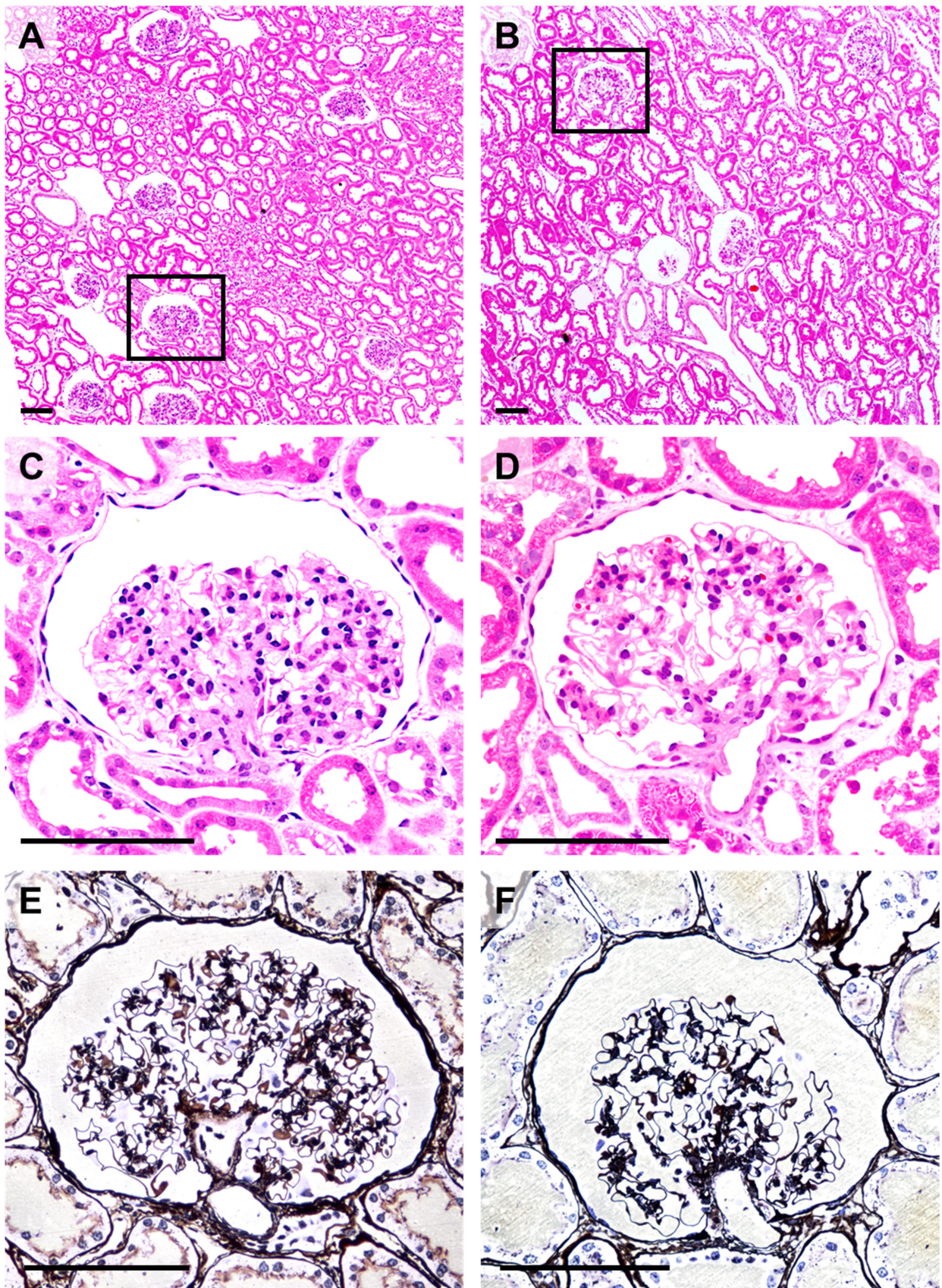
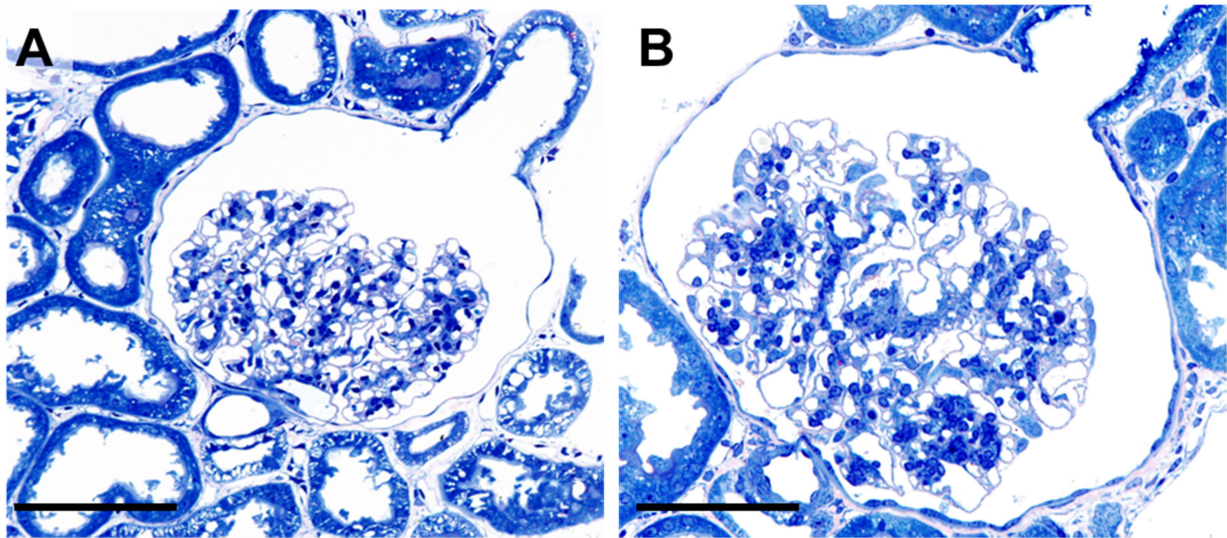


Abbildung 12: Repräsentative histologische Schnitte von in Kunststoff eingebettetem Nierengewebe eines Wildtypkontrolltiers (A, C und E) und eines *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweins (B, D und F). A–D: Hämatoxylin-Eosin-Färbung. E und F: Versilberung nach Rambourg kombiniert mit



der PAS-Reaktion. Maßstab je 100 µm. A und B: 40fache Vergrößerung. D–F: 100fache Vergrößerung. A und B: Die Nierenrinde des transgenen Schweins zeigt keine Dm-assozierten Alterationen im Vergleich zum Wildtypkontrolltier. C–D: Jeweils vergrößerter Ausschnitt aus A und B. C–F: äquatorial getroffene Glomerulumschnittsprofile. In beiden Färbungen zeigen die Glomerula des transgenen Tiers keinen Hinweis auf morphologische Alterationen.



**Abbildung 13:** Semidünnschnitt eines repräsentativen Glomerulumschnittsprofils eines Wildtypkontrolltiers (A) und eines  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweins (B). A und B: Toluidinblau-Safranin-Färbung. Maßstab: 100 µm.

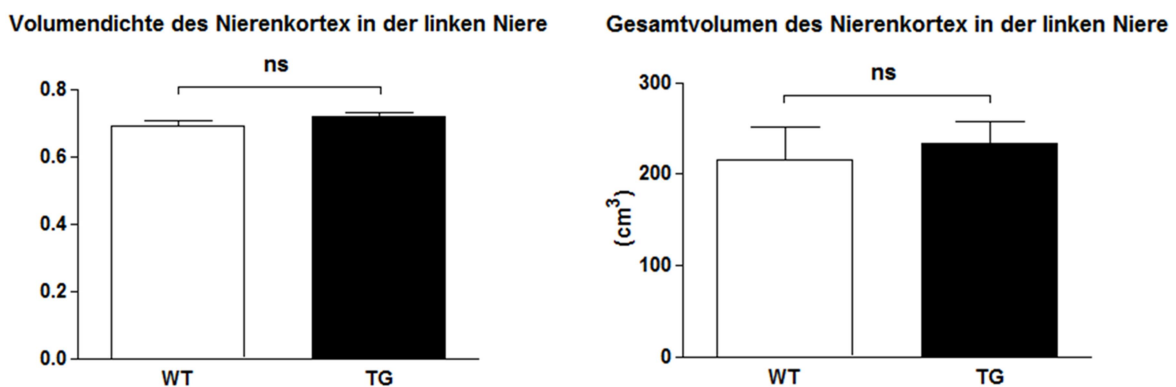
### 4.3.3 Ergebnisse der quantitativ-stereologischen Analysen der perfusionsfixierten Nieren

#### 4.3.3.1 Volumendichte ( $V_{V(\text{Kortex/Niere})}$ ) und Gesamtvolumen ( $V_{(\text{Kortex, Niere})}$ ) des Nierenkortex in der Niere

Der Volumendichte des Nierenkortex in der Niere ( $V_{V(\text{Kortex/Niere})}$ ) wurde an den perfusionsfixierten Nieren der  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweine sowie der Kontrolltiere erhoben.

Zwischen den Wildtypen und den transgenen Schweinen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (WT:  $0,69 \pm 0,01$ ; TG:  $0,72 \pm 0,02$  (Kontrolleber: 0,75; transgener Eber: 0,74)).

Auch das gesamte Volumen des Nierenkortex der transgenen Tiere zeigte keine Abweichungen im Vergleich zu den Kontrolltieren (WT:  $215 \pm 35 \text{ cm}^3$ ; TG:  $234 \pm 23 \text{ cm}^3$  (Kontrolleber: 397  $\text{cm}^3$ ; transgener Eber: 169  $\text{cm}^3$ )) (siehe Abbildung 14).



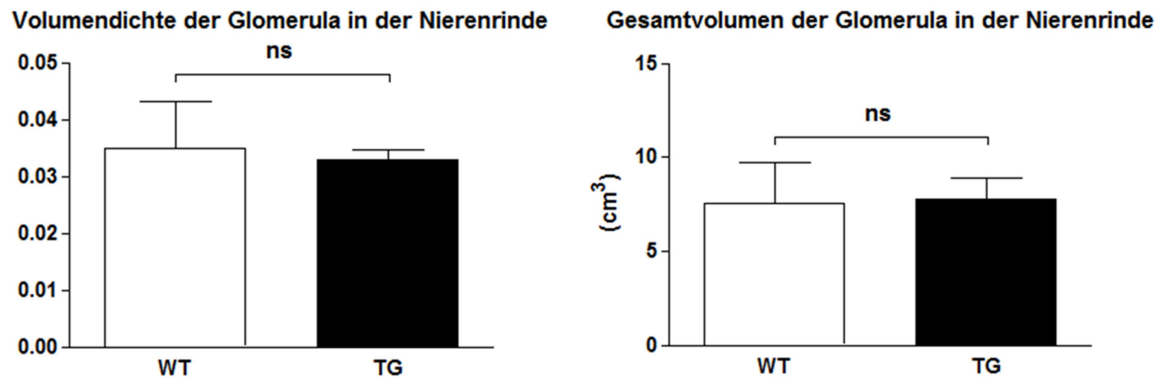
**Abbildung 14: Volumendichte ( $V_{V(\text{Kortex/Niere})}$ ) und gesamtes Volumen ( $V_{(\text{Kortex, Niere})}$ ) der Nierenrinde in der Niere bei den Wildtypkontrolltieren und den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen.**

WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant.

#### **4.3.3.2 Volumendichte ( $V_{V(\text{Glom/Kortex})}$ ) und Gesamtvolumen ( $V_{(\text{Glom, Kortex})}$ ) der Glomerula im Nierenkortex**

Die Volumendichte der Glomerula in der Nierenrinde wies keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Tiergruppen auf (WT:  $0,035 \pm 0,008$  vs.  $0,033 \pm 0,002$  (Kontrolleber: 0,025; transgener Eber: 0,044)).

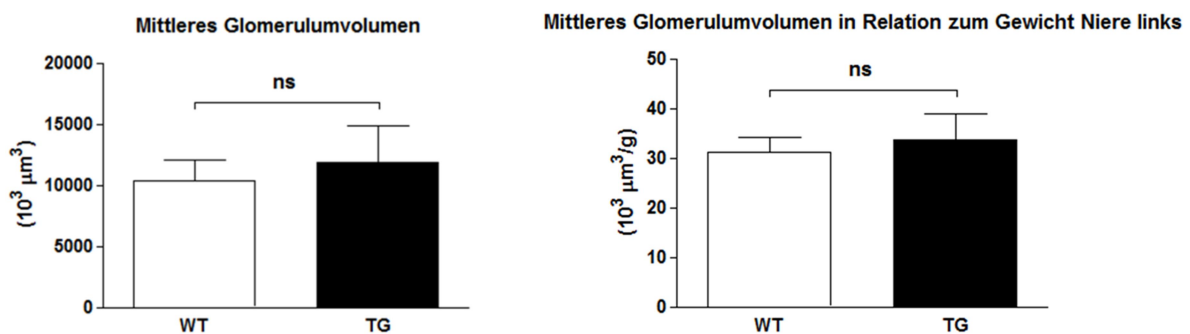
Auch bei der Auswertung des gesamten Volumens der Glomerula in der Nierenrinde zeigte sich kein signifikanter Unterschied (WT vs. TG:  $7,52 \pm 2,18 \text{ cm}^3$  vs.  $7,78 \pm 1,16 \text{ cm}^3$  (Kontrolleber: 10,0  $\text{cm}^3$ ; transgener Eber: 7,5  $\text{cm}^3$ )) (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: Volumendichte ( $V_{V(\text{Glom/Kortex})}$ ) und gesamtes Volumen ( $V_{(\text{Glom, Kortex})}$ ) der Glomerula in der Nierenrinde bei den Wildtypkontrolltieren und den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen. WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant.**

#### 4.3.3.3 Mittleres Glomerulumvolumen ( $\bar{V}_{(\text{Glom})}$ )

Das mittlere Glomerulumvolumen ( $\bar{V}_{(\text{Glom})}$ ) der  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweine zeigte keinen signifikanten Unterschied zu dem der Kontrolltiere (WT:  $10357 \pm 1745 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ ; TG:  $11900 \pm 2994 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  (Kontrolleber:  $9548 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ ; transgener Eber:  $6579 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ )). Auch im Verhältnis zum Nierengewicht ( $\bar{V}_{(\text{Glom})}/\text{Gewicht}_{(\text{Niere links})}$  (in  $10^3 \mu\text{m}^3/\text{g}$ )) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (WT:  $31,08 \pm 3,07 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{g}$ ; TG:  $33,67 \pm 5,31 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{g}$  (Kontrolleber:  $16,75 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{g}$ ; transgener Eber:  $26,85 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{g}$ )) (siehe Abbildung 16).

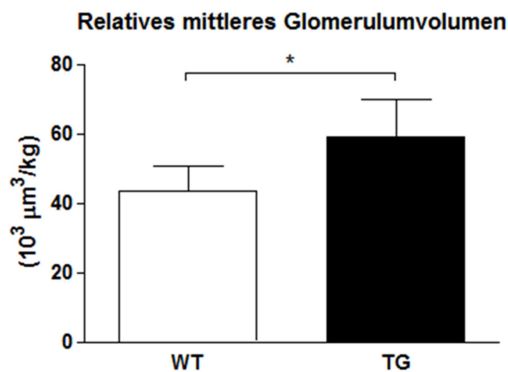


**Abbildung 16: mittleres Glomerulumvolumen ( $\bar{V}_{(\text{Glom})}$ ) und Verhältnis des mittleren Glomerulumvolumens zum Nierengewicht der perfusionsfixierten Niere bei den**

**Wildtypkontrolltieren und den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier.

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant.

Bei Betrachtung des mittleren Glomerulumvolumens, bezogen auf das Körpergewicht, ( $\bar{V}_{(Glom)}/KGW$  (in  $10^3 \mu m^3/kg$ )), zeigte sich eine signifikante Erhöhung bei den transgenen Schweinen um 26% (WT vs. TG:  $44 \pm 7 \times 10^3 \mu m^3/kg$  vs.  $59 \pm 11 \times 10^3 \mu m^3/kg$  (Kontrolleber:  $28 \times 10^3 \mu m^3/kg$ ; transgener Eber:  $29 \times 10^3 \mu m^3/kg$ )) (siehe Abbildung 17).



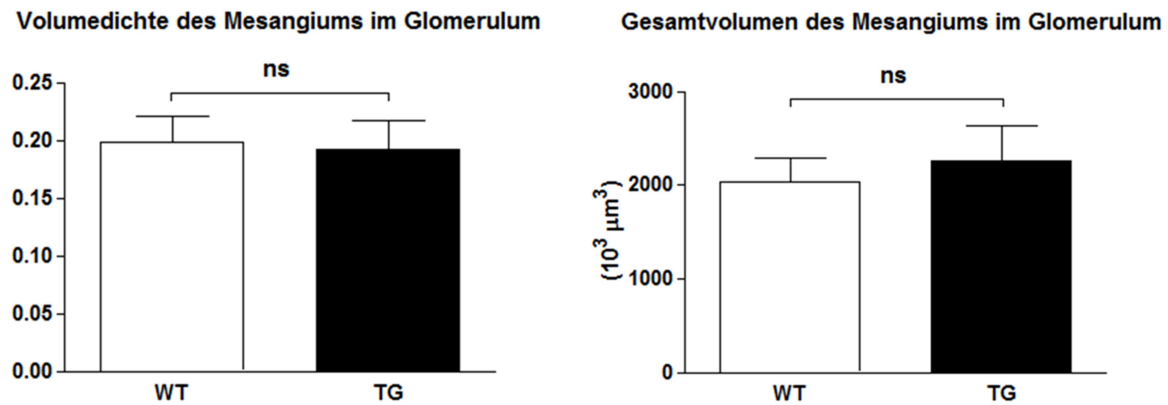
**Abbildung 17: Verhältnis des mittleren Glomerulumvolumens zum Körpergewicht bei den Wildtypkontrolltieren und den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier.

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. \*:  $p < 0,05$ .

#### **4.3.3.4 Volumendichte ( $V_{V(Mes/Glom)}$ , $V_{V(Pod/Glom)}$ ), Gesamtvolumen ( $V_{(Mes, Glom)}$ , $V_{(Pod, Glom)}$ ) des Mesangiums bzw. der Podozyten im Glomerulum und mittleres Podozytenvolumen ( $\bar{V}_{(Pod)}$ )**

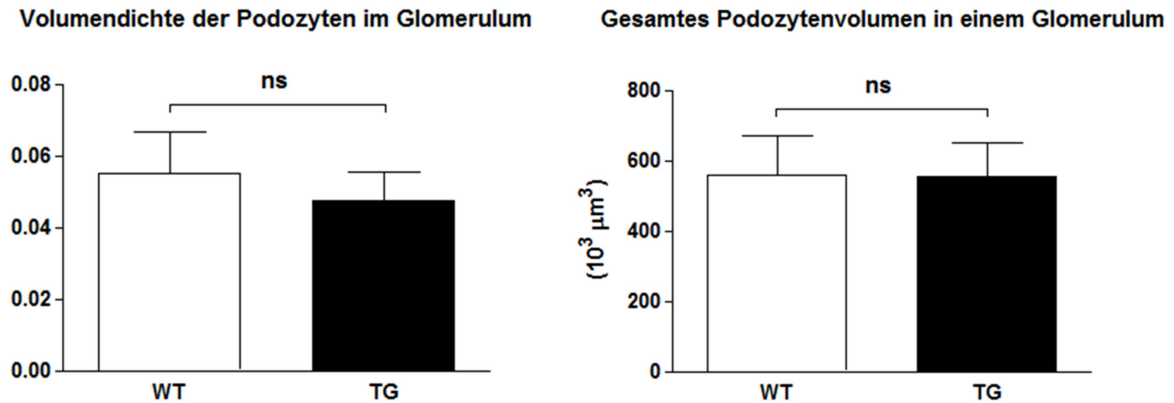
Die Volumendichte des Mesangiums im Glomerulum ( $V_{V(Mes/Glom)}$ ) und das gesamte Volumen des Mesangiums ( $V_{(Mes, Glom)}$ ) im Glomerulum unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Wildtypkontrolltieren und den transgenen Schweinen (WT vs. TG: Volumendichte des Mesangiums im Glomerulum:  $0,198 \pm 0,023$  vs.  $0,192 \pm 0,025$  (Kontrolleber:  $0,202$ ; transgener Eber:  $0,217$ ); gesamtes Mesangiumvolumen:

$2032 \pm 264 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  vs.  $2249 \pm 425 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  (Kontrolleber:  $1924 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ ; transgener Eber:  $1428 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ )) (siehe Abbildung 18).



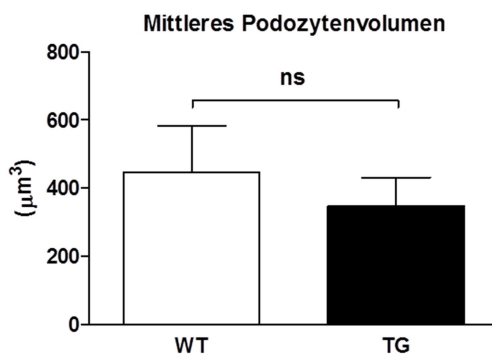
**Abbildung 18: Volumendichte ( $V_{V(\text{Mes/Glom})}$ ) und gesamtes Volumen ( $V_{(\text{Mes, Glom})}$ ) des Mesangiums im Glomerulum bei den Wildtypkontrolltieren und den weiblichen  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant.

Auch die Volumendichte der Podozyten im Glomerulum ( $V_{V(\text{Pod/Glom})}$ ) und das gesamte Volumen der Podozyten im Glomerulum ( $V_{(\text{Pod, Glom})}$ ) wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtypen und den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen auf (WT vs. TG: Volumendichte der Podozyten im Glomerulum:  $0,055 \pm 0,011$  vs.  $0,047 \pm 0,008$  (Kontrolleber:  $0,047$ ; transgener Eber:  $0,044$ ); gesamtes Podozytenvolumen:  $559 \pm 112 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  vs.  $553 \pm 98 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  (Kontrolleber:  $451 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ ; transgener Eber:  $288 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ )) (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19: Volumendichte ( $V_{V(\text{Pod}/\text{Glom})}$ ) und gesamtes Volumen ( $V_{(\text{Pod}, \text{Glom})}$ ) der Podozyten im Glomerulum bei den Wildtypkontrolltieren und den weiblichen  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant.

Das mittlere Podozytenvolumen ( $\bar{V}_{(\text{Glom})}$ ) wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypkontrolltieren und den transgenen Schweinen auf (WT:  $448 \pm 135 \mu\text{m}^3$ ; TG:  $349 \pm 83 \mu\text{m}^3$  (Kontrolleber:  $436 \mu\text{m}^3$ ; transgener Eber:  $327 \mu\text{m}^3$ )) (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20: Mittleres Podozytenvolumen der Wildtypkontrolltiere und der  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweine.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant.

#### 4.3.3.5 Numerische Dichte glomerulärer Zellen im Glomerulum

$$(N_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})})$$

Neben der numerischen Dichte aller glomerulärer Zellen (Z) im Glomerulum ( $N_{V(\text{Zellen}/\text{Glom})}$ ) wurde auch die numerische Dichte der Podozyten (P) und der Endothel- und Mesangiumzellen (E+M) im Glomerulum erhoben.

Die ermittelten Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen und den Kontrolltieren. Eine Tabelle mit einer Auflistung der Mittelwerte befindet sich im Anhang unter 9.5.

#### 4.3.3.6 Anzahl der Zellen pro Glomerulum ( $N_{(\text{Zellen}, \text{Glom})}$ )

Die Gesamtanzahl der glomerulären Zellen im Glomerulum ( $N_{(\text{Zellen}, \text{Glom})}$ ) sowie die Anzahl der einzelnen Zelltypen (Podozyten, Endothelzellen und Mesangiumzellen) im Glomerulum wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den nicht transgenen Kontrolltieren und den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen auf (siehe Abbildung 21).

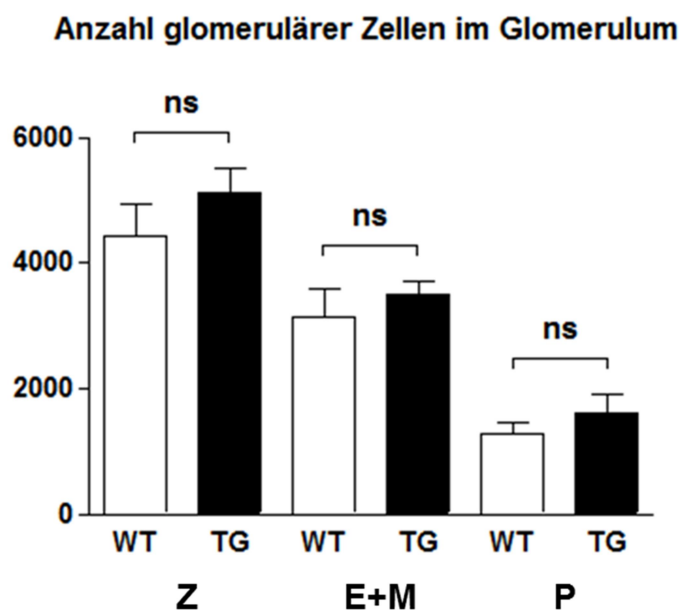
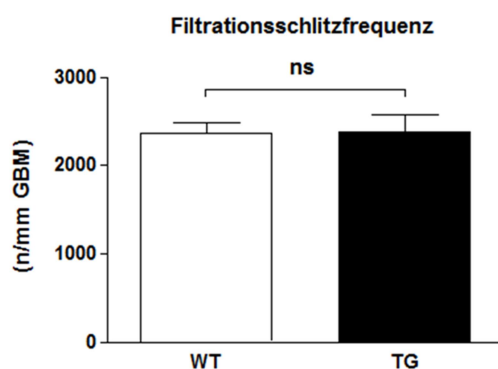


Abbildung 21: Anzahl der Zellen pro Glomerulum bei den Wildtypkontrolltieren und bei den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen. WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$

SD dargestellt. Z: glomeruläre Zellen. E+M: Endothelzellen und Mesangiumzellen. P: Podozyten. ns: nicht signifikant.

#### 4.3.3.7 Filtrationsschlitzfrequenz (FSF)

Die Filtrationsschlitzfrequenz (FSF), angegeben als FS/mm GBM wurde an den peripheren glomerulären Kapillaren ermittelt und zeigte bei den transgenen diabetischen Schweinen keinen signifikanten Unterschied zu den nicht diabetischen Kontrolltieren (WT:  $2,36 \pm 0,12$ ; TG:  $2,37 \pm 0,20$  (Kontrolleber: 2,44; transgener Eber: 2,39)) (siehe Abbildung 22).

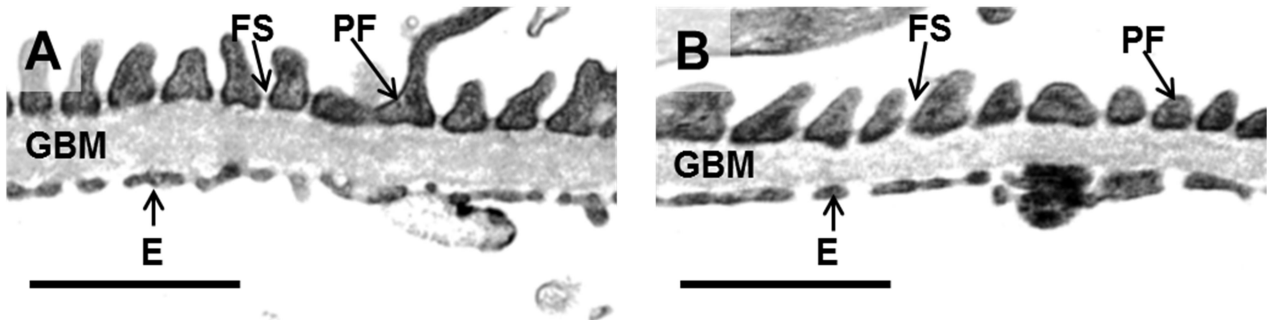


**Abbildung 22: Filtrationsschlitzfrequenz (FSF) pro mm glomerulärer Basalmembran (GBM) bei den Wildtypkontrolltieren und den *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant.

#### 4.3.3.8 Dicke der glomerulären Basalmembran ( $T_{h(GBM)}$ )

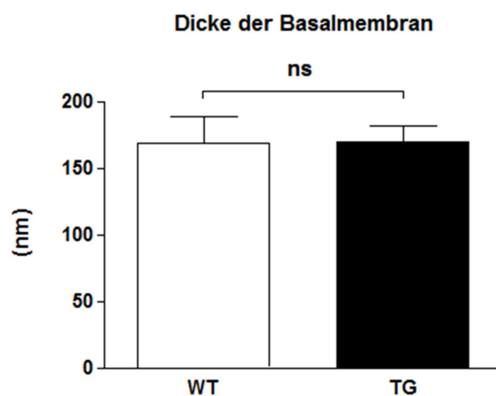
Die morphologische Betrachtung elektronenmikroskopischer Bilder der glomerulären peripheren Basalmembranen ergab keine Hinweise auf eine Verdickung der GBM bei den diabetischen transgenen Tieren (siehe Abbildung 23).





**Abbildung 23: Repräsentativer Abschnitt der GBM eines Wildtypkontrolltiers (A) und eines transgenen Schweins (B).** Ultradünnschnitte. Maßstab 1000 nm. GBM: glomeruläre Basalmembran. E: Endothelzelle. PF: podozytärer Fußfortsatz. FS: Filtrationsschlitz.

Auch die quantitativ-stereologische Auswertung der Basalmembrandicke ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den nicht diabetischen Wildtypen und den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen diabetischen Schweinen (WT:  $169 \pm 20$  nm; TG:  $169 \pm 13$  nm (Kontrolleber: 311 nm; transgener Eber: 276 nm)) (siehe Abbildung 24). Die GBM der männlichen Schweine war auffallend dicker, als die der weiblichen Tiere.

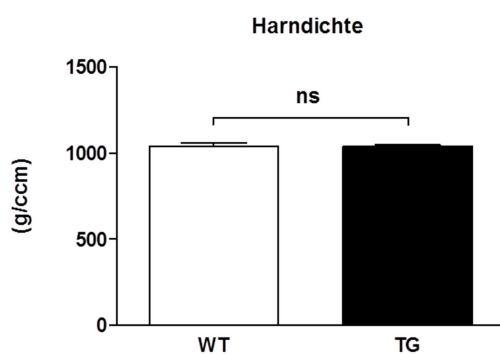


**Abbildung 24: Wahre harmonische mittlere Basalmembrandicke (in nm) bei den weiblichen Wildtypkontrolltieren und den weiblichen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant.

## 4.4 Ergebnisse der Urinuntersuchung

### 4.4.1 Harndichte

Die Messung der spezifischen Dichte des Urins ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den diabetischen *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen und den Wildtypkontrolltieren (WT vs. TG: 1040 ± 17,8 g/ccm vs. 1039 ± 8 g/ccm (Kontrolleber: 1038 g/ccm; transgener Eber: 1040 g/ccm)) (siehe Abbildung 25).



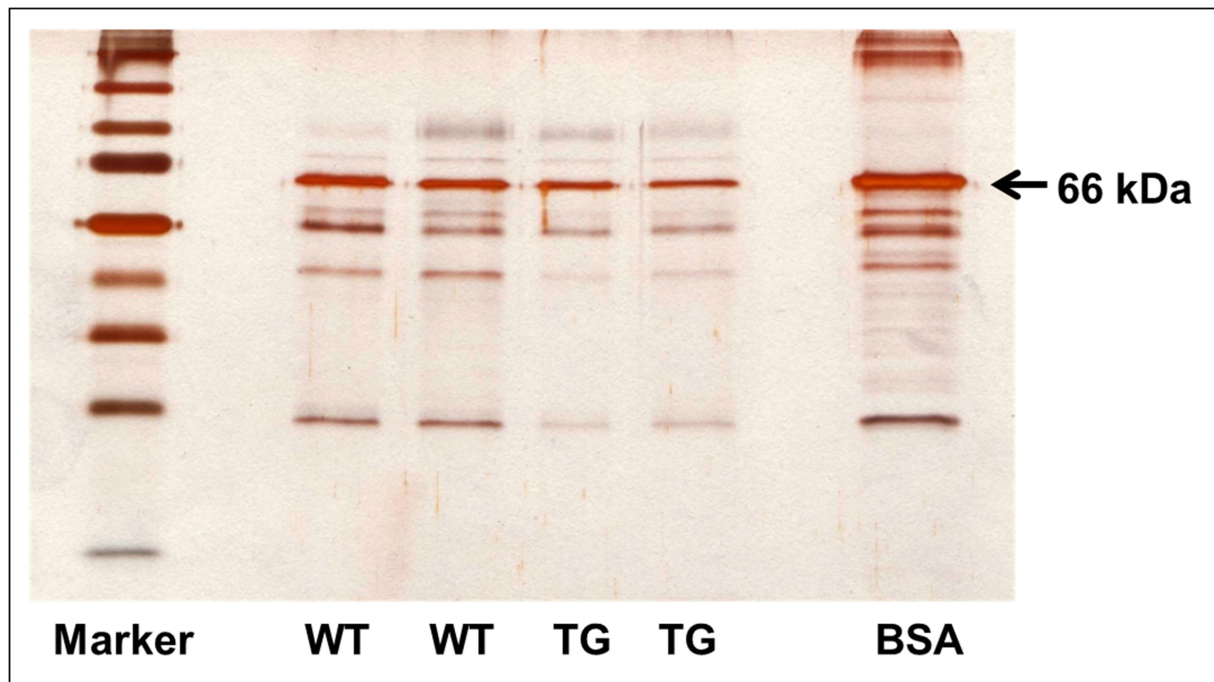
**Abbildung 25: Harndichte der Wildtypkontrolltiere und der zweijährigen *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweine.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. ns: nicht signifikant.

### 4.4.2 SDS-PAGE Urinproteinanalyse

Die Untersuchung des Urins der *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweine und der Wildtypkontrolltiere auf das Auftreten einer Albuminurie erfolgte mittels gelelektrophoretischer Proteinauftrennung (SDS-PAGE, siehe 3.5.2).

Bei den transgenen Tieren und den Wildtypkontrolltieren wurden die Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa, was dem Molekulargewicht von standardisiertem bovinem Serumalbumin entspricht, miteinander verglichen.

Sowohl bei den weiblichen *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen, als auch bei dem dreijährigen transgenen Eber konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren keine erhöhte Ausscheidung von Albumin in den Urin nachgewiesen werden (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: SDS-PAGE Urinprotein-Analyse bei den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen und den Kontrolltieren.** Marker: vorgefärbter Proteingewichtsmarker (Broad Range, Biorad, Deutschland) mit sichtbaren Gelbändern, die Standard-Proteingewichte anzeigen (von unten nach oben: 6,5 kDa, 14,4 kDa, 12,5 kDa, 31 kDa, 45 kDa, 66,2 kDa, 97,4 kDa, 116,3 kDa, 200 kDa). WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. BSA: standardisiertes bovines Serumalbumin mit einem Molekulargewicht von 66 kDa.

## 4.5 Ergebnisse der Untersuchung des Nervus fibularis communis

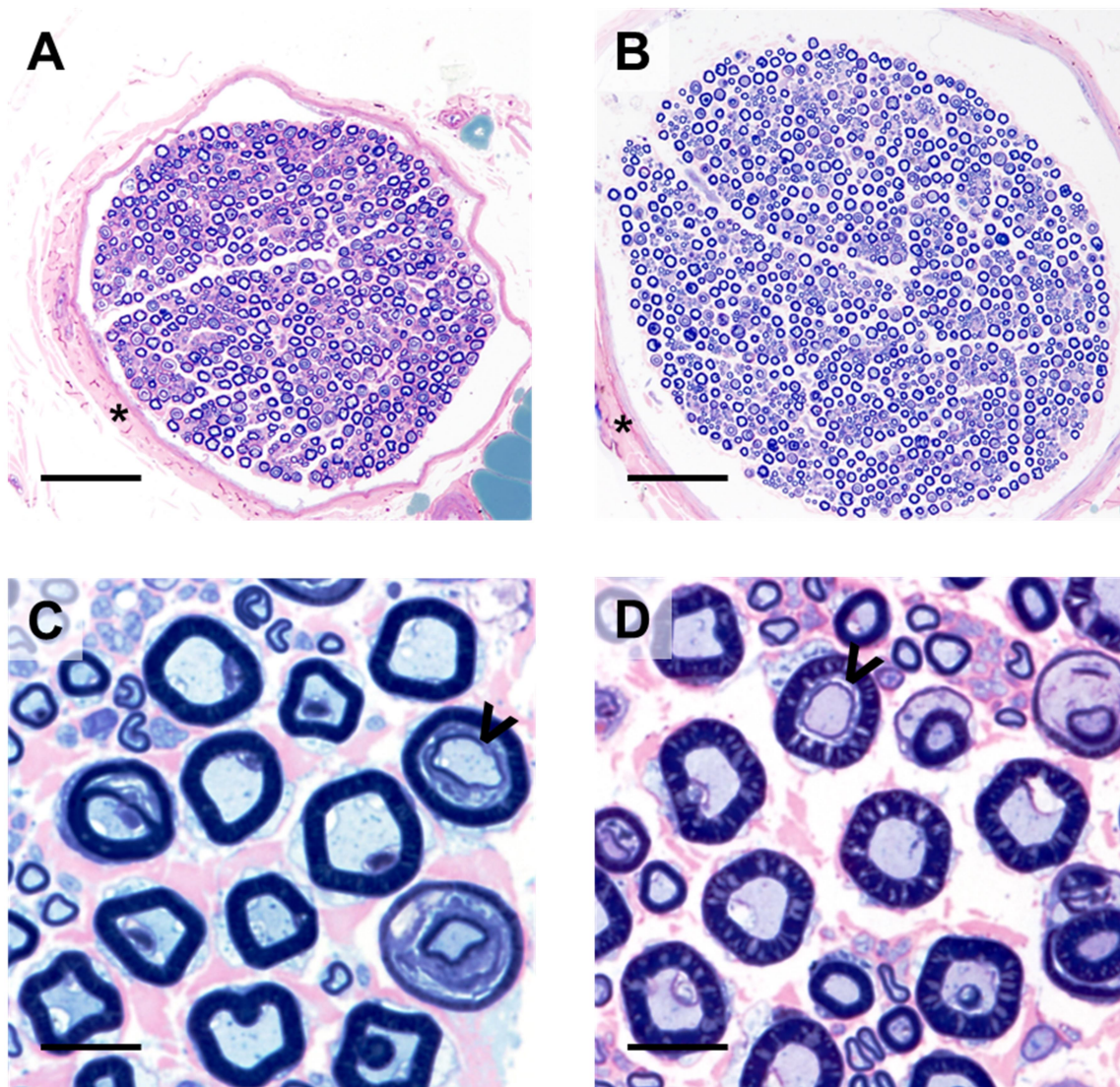
### 4.5.1 Qualitativ-histologische Untersuchungsbefunde des Nervus fibularis communis

Für die qualitativ-histologische Beurteilung des Nervengewebes wurden zum einen Hämatoxylin-Eosin gefärbte Paraffinschnitte, zum anderen Toluidinblau-Safranin gefärbte Semidünnschnitte des Nervus fibularis herangezogen. Außerdem wurden Nervenzupfpräparate des Nervus fibularis ausgewertet.

Besonderes Augenmerk wurde auf Gewebealterationen gerichtet, die bei der humanen diabetischen Neuropathie auftreten. Der Nervenfaserschwund und der Markscheidenschwund stellen dabei die pathologischen Hauptmerkmale dar (Anzil

2012). Sie zeichnen sich aus durch axonale Degeneration, primäre und sekundäre Demyelinisierung und Remyelinisierung (erkennbar an einem hohen Anteil von Nervenfasern mit sehr dünner Myelinscheide), Proliferation von Schwann-Zellen und durch die Verdickung der Basalmembranen (Sanada et al. 2015).

Die vergleichende Auswertung der Nervenproben *INS<sup>C94Y</sup>* transgener Schweine und der Wildtypkontrolltiere erbrachte keine Hinweise auf Dm-assoziierte Alterationen des Nervus fibularis communis bei den transgenen Tieren. Beide Gruppen zeigten eine physiologische Morphologie des Nervengewebes und der umgebenden Strukturen, wie Nervenscheiden und Gefäße (siehe Abbildungen 27 und 28).



**Abbildung 27: Repräsentative Semidünnschnitte des Nervus fibularis communis eines Wildtypkontrolltiers (A und C) und eines *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweins (B und D).** Toluidinblau-Safranin-Färbung. Maßstab 100 µm, 100fache Vergrößerung (A und B) bzw. 10 µm, 1000fache Vergrößerung (C und D). A und B zeigen jeweils ein Nervenfaszikel umgeben von Perineurium (\*). Innerhalb des Faszikels sind die einzelnen Nervenfasern zu erkennen. B und D: Darstellung der Nervenfasern aus A und B in höherer Vergrößerung. Sowohl kleine, als auch große Nervenfasern, bestehend aus Axonen und Myelinscheiden, sind zu sehen. (>): Schmidt-Lanterman Inzisuren. Dm-assozierte Alterationen sind nicht zu erkennen.





**Abbildung 28:** Repräsentative Nervenzupfpräparate eines Wildtypkontrolltiers (A und C) und eines *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweins (B und D). Osmiumtetroxid-Schwärzung mit anschließender Hämalaunfärbung. Maßstab 100 µm. A und B 100fache Vergrößerung. C und D 400fache Vergrößerung. Die Nervenfasern beider Tiere weisen eine physiologische homogene Myelinisierung auf.

## 4.5.2 Ergebnisse der quantitativ-stereologischen Analysen des Nervus fibularis communis

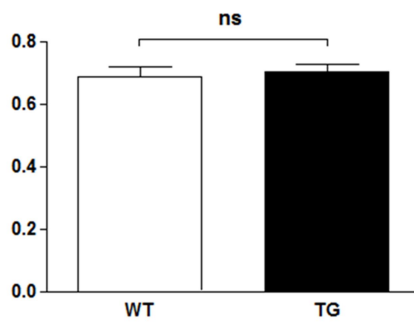
### 4.5.2.1 Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern

$$(V_{V(\text{Myelin/NF})})$$

Die Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern ( $V_{V(\text{Myelin/NF})}$ ) wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtypkontrolltieren und den zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen auf (WT:  $0,685 \pm 0,031$ ; TG:  $0,702 \pm 0,025$  (Kontrolleber:  $0,704$ ; transgener Eber:  $0,694$ )) (siehe Abbildung 29).

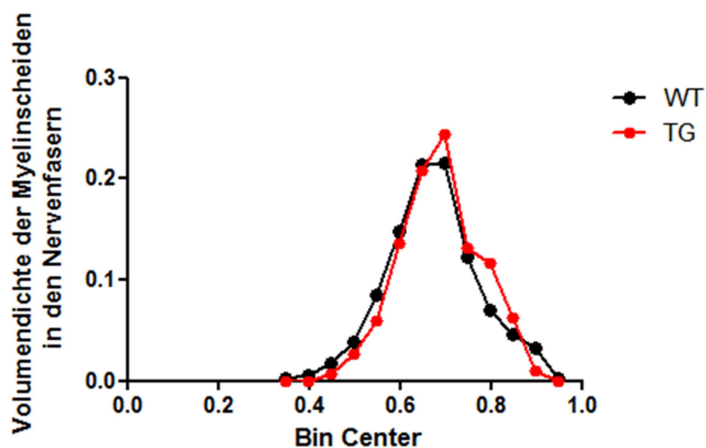
Die Einzelwerte der Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern waren bei den Wildtypkontrolltieren und den transgenen Tieren nahezu identisch verteilt. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen ermittelt werden (siehe Abbildung 30).

Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern



**Abbildung 29: Volumendichte ( $V_{V(\text{Myelin/NF})}$ ) der Myelinscheiden in den Nervenfasern bei den Wildtypkontrolltieren und den weiblichen  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant. Die Werte zwischen den beiden Tiergruppen zeigen ein nahezu identisches Ergebnis.

**Histogramm der Einzelwertverteilung der Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern**

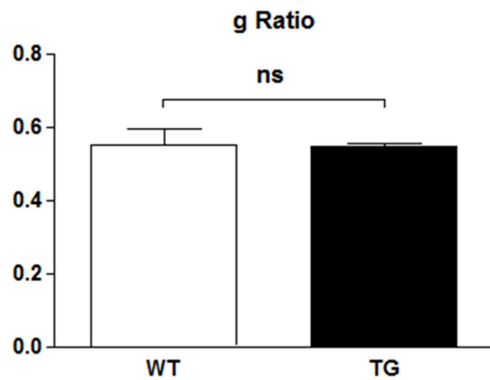


**Abbildung 30: Histogramm der Einzelwertverteilung der Volumendichte der Myelinscheiden in den Nervenfasern ( $V_{V(\text{Myelin/NF})}$ ) bei den Wildtypkontrolltieren und den  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen.** WT: Wildtypen. TG: transgene Tiere. Die Ordinate zeigt die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Werte von  $V_{V(\text{Myelin/NF})}$ , die Abszisse die einzelnen Klassen (bins), denen die Einzelwerte zugeteilt werden. Sowohl bei den transgenen Tieren als auch bei den Wildtypen fallen die Einzelwerte von  $V_{V(\text{Myelin/NF})}$  am häufigsten in Klasse 4 (0,6-0,8).

#### 4.5.2.2 g-Ratio nach Rushton

Die Ermittlung der g-Ratio ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen und den Wildtypkontrolltieren (WT vs. TG:  $0,550 \pm 0,045$  vs.  $0,548 \pm 0,008$  (Kontrolleber: 0,515; transgener Eber: 0,514)) (siehe Abbildung 31).

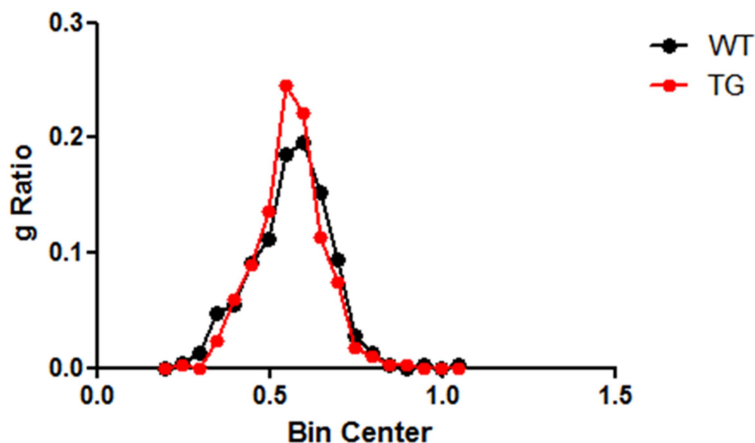
Die Häufigkeitsverteilung der Einzelwerte der g-Ratio bei den Wildtypkontrolltieren und bei den transgenen Schweinen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen (siehe Abbildung 32).



**Abbildung 31: g-Ratio der Wildtypkontrolltiere und der *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweine.** WT: Wildtyp. TG: transgenes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. ns: nicht signifikant



### Histogramm der Einzelwertverteilung der g Ratio



**Abbildung 32: Histogramm der Einzelwertverteilung der g-Ratio bei den Wildtypkontrolltieren und den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen.** WT: Wildtypen. TG: transgene Tiere. Die Ordinate zeigt die Häufigkeitsverteilung einzelnen Werte der g-Ratio, die Abszisse die einzelnen Klassen (bins), denen die Einzelwerte zugeteilt werden. Sowohl bei den transgenen Tieren als auch bei den Wildtypen fallen die Einzelwerte der g-Ratio am häufigsten in Klasse 2 (0,5-1,0).

## 4.6 Ergebnisse der Untersuchung ausgewählter Blutgefäße

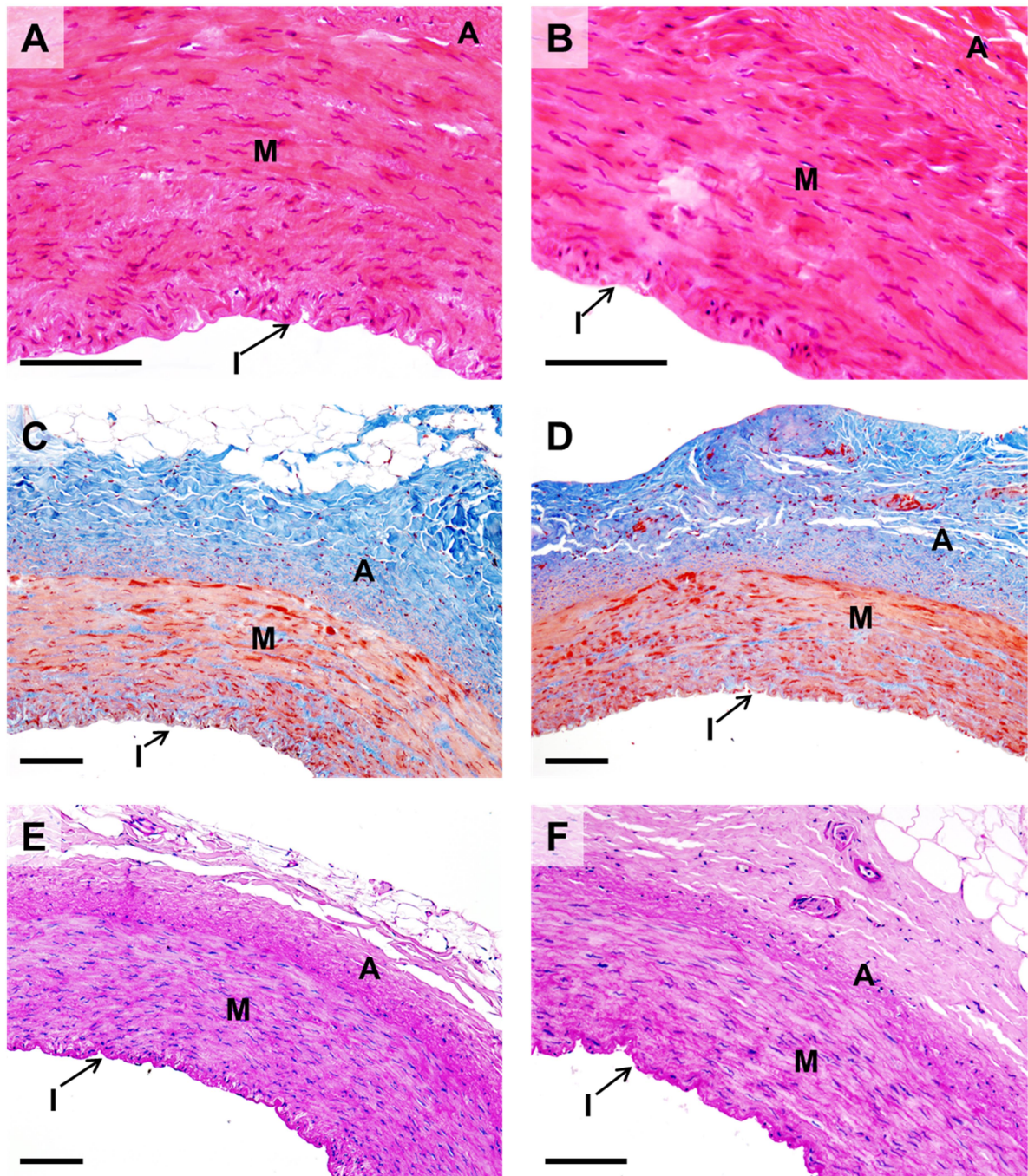
### 4.6.1 Qualitativ-histologische Untersuchungsbefunde ausgewählter

#### Blutgefäße

Die Untersuchung auf das Vorliegen einer diabetischen Makroangiopathie wurde an repräsentativen Gefäßen, die auch beim Menschen zur Entwicklung diabetischer Alterationen neigen, durchgeführt. Unter anderem wurden in Paraffin eingebettete Gewebeproben der Aorta, der Arteria carotis und der Koronararterien beurteilt. Um bereits frühe Anzeichen für das Vorliegen Dm-assoziierter Alterationen zu erkennen, wurden verschiedene histologische Spezialfärbungen der Gefäßschnitte angefertigt: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Pikrosirius-Rot-Färbung, Elastika-van-Gieson-Färbung, Von-Kossa-Färbung, Masson-Trichrom-Färbung und die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (Bindegewebsfärbungen, Färbungen zum Nachweis von Kalzifikationen und kohlenhydrathaltigen Strukturen).

Bei der mikroskopischen Befundung der Gefäßschnitte wurde besonders auf die beim Menschen auftretenden verschiedenen Stadien einer diabetischen Atherosklerose geachtet: Intimaverdickung mit Ansammlung von Lipidtröpfchen und Schaumzellen (Stadium 1), Fatty-Streak-Formationen (2), extrazelluläre Lipidakkumulationen (3), Atherome (4) und Fibroatherome (5) (Santos et al. 2008, Perrotta 2013). Außerdem wurde ein besonderes Augenmerk auf Kalzifikationen in der Gefäßwand gerichtet, da deren Vorkommen in prozinen Atherosklerosemodellen besonders dokumentiert ist (Gerrity et al. 2001, Ludvigsen et al. 2015).

Die zweijährigen weiblichen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine, sowie der dreijährige *INS<sup>C94Y</sup>* transgene Eber zeigten keine pathologischen Befunde der Gefäßwände im Vergleich zu den Kontrolltieren. Es konnten keine Hinweise auf das Vorliegen Dm-assoziierter Alterationen gefunden werden (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 33: Repräsentative histologische Schnitte der linken Koronararterie eines Wildtypkontrolltiers (A, C und E) und eines *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweins (B, D und F). A und B: Hämatoxylin-Eosin-Färbung. C und D: Masson-Trichrom-Färbung. E und F: PAS-Reaktion. Maßstab: 100 µm. A und B: 200fache Vergrößerung. C-F: 100fache Vergrößerung. I, M und A: Gefäßwandschichtung (I: Tunica intima. M: Tunica media. A: Tunica adventitia). A und B: auch in hoher Vergrößerung stellt sich die Tunica intima des transgenen Tiers im Vergleich zum Kontrolltier unverdickt dar. C und D: Bei der Masson-Trichrom-Färbung stellen sich Muskelzellen rot dar, Kollagen blau. Es sind keine Hinweise für das Vorliegen Dm-assoziierter Gefäßläsionen vorhanden. E und F:**

Auch die PAS-Reaktion, die zur Darstellung glykogenhaltiger Gewebsbestandteile verwendet wird, zeigt keine Hinweise auf atherosklerotische Alterationen bei dem transgenen Tier.

## 5. Diskussion

### 5.1 Grundlagen und Ziele der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Organproben von langzeitdiabetischen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen aus der *Munich MIDY-Pig Biobank* durch qualitative und quantitative morphologische Analyseverfahren im Hinblick auf das Auftreten Diabetes mellitus-assoziiierter Alterationen untersucht. Zudem wurden Urinproteinanalysen durchgeführt, um das Vorliegen einer Albuminurie zu untersuchen.

Die Verwendung von Schweinen als Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Aufgrund ihrer großen physiologischen und anatomischen Ähnlichkeit zum Menschen, der frühen Geschlechts- bzw. Zuchtreife (Sau: mit 5-8 bzw. 7-8 Monaten, Eber mit 4-7 bzw. 6-8 Monaten), der verhältnismäßig kurzen Reproduktionsintervalle mit Wurfgrößen von 9-16 Ferkel (Peitz und Peitz 2000) und der etablierten standardisierbaren Haltung besitzen Schweine gegenüber anderen Versuchstierspezies entscheidende Vorteile (Bellinger et al. 2006, Cefalu 2006, Chatzigeorgiou et al. 2009, Torres-Rovira et al. 2012, Wolf et al. 2014). Dennoch ist die Haltung von Schweinen im Vergleich zu klassischen Labornagerspezies deutlich personal- und kostenintensiver und beansprucht mehr Platz. Außerdem haben Schweine eine sehr viel höhere Lebenserwartung als Nagetiere, was die für Studien beanspruchte Zeit verlängert und somit die Haltungskosten erhöht. Daher ist das gewonnene Probenmaterial von Schweinen sehr wertvoll. Dies gilt insbesondere für genetisch modifizierte Schweinemodelle, die zur Erforschung chronischer Erkrankungen bzw. Spätfolgen von krankhaften Zuständen und Veränderungen verwendet werden. Diese Umstände limitieren insbesondere bei genetisch modifizierten Schweinemodellen die Anzahl der Tiere, welche zu einem bestimmten Zeitpunkt zur Verfügung stehen.

Zur optimalen Ausnutzung der Tiere und der von ihnen generierbaren Gewebeproben wurde im Sommer 2014 mit der *Munich MIDY-Pig Biobank* die erste Biobank genetisch modifizierter Dm-Modelle etabliert. Sie enthält Gewebeproben von über 40 Organen und Geweben der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine und der Wildtypkontrolltiere (Blutke et al. 2014, Abbott 2015). Mithilfe der Biobank können Wissenschaftler, die auf dem Gebiet der Dm-Forschung tätig sind, auf standardisierte und im Hinblick auf Dm-assoziierte Alterationen eingehend charakterisierte Gewebe- und Körperflüssigkeitenproben zurückgreifen und diese für weitere Studien verwenden (Albl et al. 2016). Dies ermöglicht die Durchführung von unterschiedlichsten Analyseverfahren an definierten repräsentativen Proben verschiedener Organsysteme und eröffnet die Möglichkeit die Effekte von chronischer Hyperglykämie und Hypoinsulinämie in einem einzigen Tiermodell in „Multi-Organ-Multi-Omics“ Ansätzen zu erfassen (Biobankpaper).

Die Proben der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine und der Kontrolltiere wurden auf Grundlage etablierter Guidelines für die Probennahme bei Nagern gewonnen und eigens hierfür unter Berücksichtigung der porcinen Anatomie und Physiologie an das Schwein angepasst (Ruehl-Fehlert et al. 2003, Blutke et al. 2014). Diese Richtlinien wurden in der Planungsphase der Erstellung der Biobank für mehr als 40 unterschiedliche Organe und Gewebe etabliert, um die reproduzierbare Generierung repräsentativer Probenmaterialien zu gewährleisten (diese wurden 2016 im Fachjournal *Toxicologic Pathology* veröffentlicht und stellen somit die ersten umfassenden Probengewinnungsleitlinien für porcine Modelle in der translationalen Forschung dar) (Albl et al. 2016). Um die Erstellung repräsentativer Proben zu gewährleisten, wurden die in verschiedenen Organen/Geweben zu beprobenden Lokalisationen durch systematisch zufällige Beprobungsverfahren bestimmt (sog. „systematic random sampling“) (Howard und Reed 2005). Aus den systematisch

zufällig bestimmten Lokalisationen wurden dann Gewebeproben entnommen, aliquotiert und entsprechend der Anforderungen verschiedener weiterführender Analysemethoden prozessiert. Diese umfassen qualitative und quantitative morphologische Untersuchungen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene (Verwendung unterschiedlicher Fixantien und Einbettungsmedien wie Formaldehydlösung, Methacarnfixans, Alkoholfixierung, Einbettung in Paraffin, GMA/MMA oder Epon, sowie Anfertigung von Proben für gefrierschnitthistologische Untersuchungen), Randomisierung der Orientierung der Proben zur Anschnittsebene für quantitativ-stereologische Analysen und für molekularbiologische Analysen (Genom-, Transkriptom-, Proteom-, Metabolom- und Lipidomanalysen) und biochemische und mikrobiologische Untersuchungsverfahren (Albl et al. 2016).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten qualitativen und quantitativen morphologischen Analysen von Proben diabetischer *INS<sup>C94Y</sup>* transgener Schweine und der Wildtypkontrolltiere umfassten Organe und Gewebe, bei denen beim Menschen Dm-assozierte Alterationen beobachtet werden (Lichtenauer et al. 2003).

Die diabetische Nephropathie ist durch die Entwicklung von pathologischen Alterationen der Nieren charakterisiert, die einen Funktionsverlust des Organs nach sich ziehen. Morphologische Alterationen der Nerven, die zu neurologischen Auffälligkeiten bei den Patienten führen, kennzeichnen die diabetische Neuropathie. Die diabetische Makroangiopathie manifestiert sich in Form von atherosklerotischen Alterationen der Blutgefäße, die zu Herzinfarkten, zerebralen Insulten und Gefäßverschlüssen der peripheren Arterien führen können. (Lichtenauer et al. 2003, Reinehr 2005, Oikonomou und Rudofsky 2012, Rathmann et al. 2015). Das Untersuchungsspektrum bei den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen umfasste daher die Proben von Nieren, Nerven und ausgewählten Blutgefäßen. Außerdem wurde das

Pankreas analysiert, das mit seinem endokrinen Anteil für die Insulinproduktion im Körper zuständig ist und somit das Ausgangsorgan des Dm darstellt.

## **5.2 Morphologische Untersuchung des Pankreas zweijähriger *INS*<sup>C94Y</sup> transgener Schweine**

Die Bauchspeicheldrüse der transgenen Schweine und der Kontrolltiere wurde auf das Vorliegen pathologischer Alterationen untersucht. Hierfür wurden das Organgewicht sowie das Organvolumen bestimmt. Im Anschluss erfolgte eine qualitativ-morphologische Untersuchung des Pankreasgewebes sowie eine quantitativ-stereologische Analyse zur Ermittlung der Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas und des Gesamtvolumens der  $\beta$ -Zellen.

Die transgenen Tiere zeigten eine signifikante Reduktion des Pankreasgewichts und des Pankreasvolumens. Das relative Pankreasgewicht der diabetischen Schweine war deutlich (jedoch nicht signifikant) vermindert. Zudem waren die Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas und das gesamte Volumen der  $\beta$ -Zellen signifikant verringert.

Durch die immunhistochemische Darstellung von Insulin konnte das Ausmaß des Schwundes der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen im Pankreasgewebe visualisiert werden. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden bei den transgenen Schweinen in den Pankreasgewebeschnitten keine physiologisch geformten Profile der Langerhans'schen Inseln gefunden. Zudem wies die immunhistochemische Darstellung des Insulins eine deutlich abgeschwächte Intensität auf, was sich in einer verminderten Farbintensität der  $\beta$ -Zellen zeigte.

Das signifikant verringerte Gewicht und Volumen der Bauchspeicheldrüse bei den langzeitdiabetischen Schweinen, sowie das verminderte relative Pankreasgewicht spiegeln Befunde bei Menschen mit Dm wider:



Patienten mit Typ 1 Dm weisen ein um ein Drittel verkleinertes Pankreas auf im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen (Macauley et al. 2015). Auch Menschen, die an Typ 2 Dm leiden, zeigen eine Verringerung des Pankreasgewichts und des Volumens. Ursächlich hierfür ist die verringerte Insulinausschüttung in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln. Insulin ist ein potenter Wachstumsfaktor, der in der Bauchspeicheldrüse v.a. nach der Nahrungsaufnahme in hohen Konzentrationen vorliegt. Bei Typ 1 bzw. im Spätstadium auch Typ 2 Diabetikern ist die Insulinproduktion bzw. die Insulinausschüttung reduziert oder völlig eingestellt. Patienten mit chronischer Hypoinsulinämie zeigen daher eine Verringerung des Organgewichts und des Volumens (Saisho et al. 2007, Burute et al. 2014, Macauley et al. 2015, Campbell-Thompson et al. 2016).

Die *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweine, die einen permanenten neonatalen Insulinmangel-Dm ausprägen, weisen ebenfalls eine progrediente Hypoinsulinämie auf, die für die Gewicht- und Volumenreduktion der Bauchspeicheldrüse verantwortlich ist. Auch das verringerte Körpergewicht der transgenen Schweine ist auf den Mangel an Insulin als potentes anaboles Hormon zurückzuführen (Renner et al. 2013).

Durch die genetische Modifikation der *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweine kommt es an Position 340 im Insulingen zu einem Austausch der Nukleinbase Guanin zu Adenin. Dies führt im Insulinmolekül zu einem Aminosäureaustausch von Cystein zu Tyrosin und folglich einer fehlerhaften Prozessierung der Insulinvorstufen.

Der signifikante Rückgang der Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas bzw. des gesamten Volumens der  $\beta$ -Zellen bei den *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen spiegelt die Auswirkungen des fehlgefalteten Insulinproteins wider, das im endoplasmatischen Retikulum der  $\beta$ -Zellen des Pankreas akkumuliert und dadurch zu Zellstress und der Apoptose der  $\beta$ -Zellen führt (Renner et al. 2013, Wolf et al. 2014).

Bereits bei 4,5 Monate alten *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen wurde in vorherigen Studien eine Abnahme der Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas um 54%, des gesamten  $\beta$ -Zellvolumens um 72% und des gesamten Volumens der  $\beta$ -Zellen in Relation zum Körpergewicht der Schweine um 53% ermittelt (Renner et al. 2013). Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen betrug die Abnahme der Volumendichte der  $\beta$ -Zellen im Pankreas 72%, die des gesamten  $\beta$ -Zellvolumens 82% und die des gesamten Volumens der  $\beta$ -Zellen in Relation zum Körpergewicht der Schweine 79%.

Die signifikante Reduktion dieser Parameter belegt die Progredienz der  $\beta$ -Zellatrophie bei den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen. Das Fortschreiten der Veränderungen zeigt sich auch bei der qualitativ-histologischen Untersuchung der Pankreasschnitte. Bei den transgenen Tieren war aufgrund des Untergangs der  $\beta$ -Zellen keine physiologische Inselstruktur vorhanden.

### **5.3 Morphologische Untersuchung der Nieren zweijähriger *INS<sup>C94Y</sup>* transgener Schweine im Hinblick auf das Auftreten Dm-assoziierter Alterationen**

Zur Klärung der Frage, ob es bei den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen im Alter von zwei Jahren zu pathologischen, Dm-assozierten Nierenalterationen kommt, wurde zunächst die Nierenfunktion der Tiere mithilfe einer Urinanalyse auf das Auftreten einer Albuminurie geprüft. Dies stellt auch beim Menschen einen sehr frühen diagnostischen Parameter der diabetischen Nephropathie dar (Meier und Haller 2004, Wolf und Zeier 2007). Die Urinanalyse ergab keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Albuminurie bei den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen.

Auch die Harndichtemessung, die einen Indikator für die Konzentrationsfähigkeit und Ausscheidungsfunktion der Nieren darstellt (Marks et al. 2002), ergab keinen

signifikanten Unterschied zwischen den transgenen Tieren und den Wildtypkontrolltieren.

Des Weiteren wurde das Nierengewebe qualitativ-histologisch beurteilt und quantitativ-stereologischen Analysen unterzogen, um Dm-assoziierte Alterationen zu identifizieren, die bei rein qualitativer Analyse nicht erkannt werden, aber unter Umständen eine wichtige pathogenetische Relevanz besitzen. Zu den Parametern, die auch beim Menschen bzw. bei experimentellen diabetischen Tiermodellen mit Ausprägung einer diabetischen Nephropathie zur Charakterisierung der Erkrankung von Bedeutung sind, zählen Nierengewicht und Nierenvolumen, Volumendichte und gesamtes Volumen des Nierenkortex in der Niere, Volumendichte und gesamtes Volumen der Glomerula im Nierenkortex, mittleres Glomerulumvolumen, Volumendichte und gesamtes Volumen des Mesangiums bzw. der Podozyten im Glomerulum, mittleres Podozytenvolumen, numerische Dichte bzw. Anzahl glomerulärer Zellen im Glomerulum, Filtrationsschlitzfrequenz und die Dicke der glomerulären Basalmembran (Remuzzi et al. 1995, Osterby et al. 2001, Drummond und Mauer 2002, Ramage et al. 2002, Helmchen et al. 2006, Herbach et al. 2009, Tervaert et al. 2010, Amann et al. 2013).

Bei den qualitativ-histologischen Untersuchungen wurden keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen ermittelt. Sowohl auf lichtmikroskopischer Ebene, als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene waren keine pathologischen Alterationen feststellbar.

Das Nierengewicht und das Nierenvolumen der zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine unterschieden sich nicht signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Das relative Nierengewicht, bezogen auf das Körpergewicht der Schweine, wies jedoch bei den transgenen Tieren eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Gleiches zeigte sich bei der Auswertung des mittleren

Glomerulumvolumens. So waren keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Mittelwerte vorhanden, in Relation zum Körpergewicht wiesen die transgenen Tiere jedoch ein signifikant größeres mittleres Glomerulumvolumen auf als die Wildtypen. Diese Befunde sind auf das reduzierte Körpergewicht der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine zurückzuführen, das durch den Insulinmangel aufgrund des Dm bedingt ist (Renner et al. 2013).

Um das Vorliegen einer renalen und glomerulären Hypertrophie zu untersuchen, wurden weitere sensitive quantitativ-stereologische Parameter ermittelt. Die Volumendichte des Nierenkortex in der Niere wird in der Humanmedizin v.a. mittels Ultraschall als Indikator für das Vorliegen einer Nephropathie bestimmt (Omer et al. 2014). Bei den untersuchten transgenen Tieren wurden keine Abweichungen der Volumendichte des Nierenkortex in der Niere bzw. des gesamten Volumens des Nierenkortex im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt. Auch die Volumendichte der Glomerula im Nierenkortex, das gesamte Volumen der Glomerula im Nierenkortex und das mittlere Glomerulumvolumen zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtypen. Diese Ergebnisse sprechen gegen das Vorliegen einer glomerulären Hypertrophie.

Um frühstadiale Veränderungen an den Glomerula zu detektieren, wurden die Volumendichte der Podozyten bzw. des Mesangiums im Glomerulum und das gesamte Volumen der beiden Komponenten sowie das mittlere Podozytenvolumen ermittelt. Veränderungen der Volumendichte bzw. der Anzahl der Podozyten im Glomerulum sind Anzeichen für das Vorliegen einer Nephropathie. Die hoch differenzierten postmitotischen Podozyten können bei einer Schädigung der Zellen nur mit kompensatorischer Hypertrophie der verbleibenden Podozyten reagieren (Wanke et al. 2001). Durch die Hypertrophie nimmt die Vulnerabilität der Podozyten zu und es kommt zu weiteren Zellverlusten und folglich zur Denudation der GBM. Die

Lücken in der Schlitzmembran werden von parietalen Epithelzellen geschlossen. Die dadurch entstehenden Adhäsionen zwischen der GBM und der Bowman'schen Kapsel tragen zum Fortschreiten Dm-assozierten Alterationen bei (Kriz 2003, Reidy und Susztak 2009).

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen (TG vs. WT). Auch die numerische Dichte und die Anzahl der glomerulären Zellen (Podozyten, Endothelzellen und Mesangiumzellen) im Glomerulum wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Schweinen und den Wildtypkontrolltieren auf. Es waren somit keine Hinweise für eine Matrixzunahme des Mesangiums bzw. eine Mesangiumverbreiterung vorhanden. Auch für eine Abnahme der Podozyten im Glomerulum gab es aufgrund der vorliegenden Ergebnisse keine Hinweise.

Des Weiteren wurden die Dicke der glomerulären Basalmembran und die Filtrationsschlitzfrequenz bestimmt. Eine Verbreiterung der glomerulären Basalmembran gilt als früher sensitiver Parameter in der Diagnostik der diabetischen Nephropathie (Helmchen et al. 2006, Herbach et al. 2009, Tervaert et al. 2010, Amann et al. 2013). Die Filtrationsschlitzfrequenz schließlich lässt Rückschlüsse auf manifeste pathologische Alterationen bei den glomerulären Podozyten zu, wie die Retraktion der Fußfortsätze („foot process effacement“) (Pavenstadt et al. 2003, Wiggins 2007). Sie stellt einen späten Parameter bei der Untersuchung pathologischer Nierenalterationen dar.

Beide Parameter wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den transgenen diabetischen Schweinen und den Kontrolltieren auf. Somit besteht im untersuchten Alter von zwei Jahren kein Hinweis auf das Vorliegen glomerulärer und podozytärer pathologischer Alterationen bei den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen.

Zusammenfassend zeigten die funktionelle und qualitativ-histologische Analyse der Niere ebenso wie die Auswertung früher sensitiver quantitativ-morphologischer Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den zweijährigen diabetischen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen und den Wildtypkontrolltieren. Einzig die Zunahme des relativen Organgewichts der Nieren und des relativen mittleren Glomerulumvolumens wurde bei den transgenen Tieren nachgewiesen, was auf das reduzierte Körpergewicht der diabetischen Schweine zurückzuführen ist. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lagen keine Hinweise auf das Vorliegen pathologischer DM-assoziierter Alterationen an den Nieren der zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine vor, was eine renale Hypertrophie bzw. eine glomeruläre Hypertrophie als Frühstadium der diabetischen Nephropathie, wie sie beim Menschen und einigen diabetischen Nagetiermodellen zu Beginn der Erkrankung beobachtet werden (Mogensen und Andersen 1973, Osterby und Gundersen 1975, Seyer-Hansen et al. 1980, Mahimainathan et al. 2006, Gurley et al. 2010, Renner et al. 2010, Zafar und Naeem-Ul-Hassan Naqui 2010), ausschließt.

Für das Fehlen pathologischer Nierenbefunde im Hinblick auf das Auftreten einer diabetischen Nephropathie bei den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen, trotz der prolongierten Phase des klinischen Dm, kommen eine Reihe verschiedener theoretischer Ursachen in Frage. Mögliche Gründe könnten das relativ frühe Untersuchungsalter der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine von zwei Jahren, der genetische Hintergrund der Tiere, sowie eine im Rahmen der Domestizierung unbeabsichtigt „angezüchtete Dm-Resistenz“ beim Hausschwein sein.

Bei Menschen mit Dm betreffen klinisch manifeste diabetische Nierenveränderungen lediglich 20-40% der Diabetiker und die Entwicklung pathologischer Nierenalterationen tritt erst viele Jahre nach der Erkrankung an Dm (im Durchschnitt nach 10-15 Jahren) auf. (Amann und Benz 2007, Alpers und Hudkins 2011, Rüter

und Wolf 2011). Frühe morphologische Veränderungen (Verdickung der GBM, Matrixzunahme des Mesangiums und Mesangiumverbreiterung im Glomerulum) wurden beim Menschen in Biopsiestudien nach 2-8 Jahren Diabetesdauer detektiert (Drummond und Mauer 2002, Amann und Benz 2007). Auch bei verschiedenen experimentellen diabetischen Nagetiermodellen treten Nierenveränderungen erst spät, nach einigen Monaten manifesten Dm in Erscheinung. Bei *db/db* Mäusen mit C57BLKS/J genetischem Hintergrund beispielsweise tritt eine glomeruläre Hypertrophie und eine Zunahme der mesangialen Matrix erst nach 5-6 Monaten auf (Kong et al. 2013), OVE26 Mäuse mit FVB genetischem Hintergrund zeigen mit 6 Monaten eine noduläre Glomerulosklerose und Albuminurie (Betz und Conway 2016). In Relation zu der kurzen Lebensspanne von Mäusen wird deutlich, dass auch hier eine langandauernde diabetische Stoffwechsellage notwendig ist, um Dm-assoziierte Nierenalterationen zu entwickeln.

Ein weiteres Beispiel sind die genetisch modifizierten *GIPR<sup>dn</sup>* Schweine, die aufgrund der Expression eines dominant-negativen GIP-Rezeptors eine verminderte insulinotrope Wirkung des GIPs zeigen und eine prädiabetische Stoffwechsellage entwickeln. Im Alter von 1,4 Jahren wurden bei diesen Schweinen eine verminderte Glukosetoleranz sowie ein Rückgang des gesamten  $\beta$ -Zellvolumens nachgewiesen. Weitere Studien an langzeiterkrankten *GIPR<sup>dn</sup>* Schweinen könnten der Frage nachgehen, ob auch diese Tiere einen klinisch manifesten Dm mit Dm-assoziierten Alterationen in den Nieren entwickeln (Aigner et al. 2010, Renner et al. 2010, Wolf et al. 2014)

Die natürliche Lebenserwartung eines Wild- bzw. Hausschweins beträgt ca. 15-20 Jahre (Beckmann et al. 2000). Die *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine sind mit zwei Jahren somit noch verhältnismäßig jung. Betrachtet man die Diabetesdauer bis zur Manifestation diabetischer Nierenalterationen beim Menschen und einigen

Mausmodellen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Schweine noch keine Nierenalterationen aufweisen (unter der Voraussetzung der Annahme, dass das Lebensalter und die Entwicklungsdauer von Alterationen bei verschiedenen Spezies ähnlich proportioniert bzw. übertragbar sind). Aus diesem Grund sind weitere Studien an älteren *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen über das Vorliegen diabetischer Nierenveränderungen sinnvoll.

Sollten ältere *INS<sup>C94Y</sup>* transgene Schweine ebenfalls keine Dm-assozierten Nierenveränderungen entwickeln, könnte eine mögliche Ursache auch im genetischen Hintergrund der *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine begründet liegen. Bei verschiedenen diabetischen Mausmodellen ist bekannt, dass die Entwicklung diabetischer Folgeerkrankungen stark vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängt (Breyer et al. 2005). So weist der Mäusestamm C57BL/6 eine sehr viel geringere Suszeptibilität gegenüber der Entwicklung eines Dm und einer diabetischen Nephropathie auf als die Stämme FVB und DBA/2, die bei diabetischer Stoffwechsellaage zuverlässig Nierenalterationen entwickeln (Alpers und Hudkins 2011, Kong et al. 2013, Betz und Conway 2016). OVE26 Mäuse mit FVB genetischem Hintergrund zeigen fulminante Nierenveränderungen. Wird das Transgen von Linien mit C57BL/6 oder DBA/2 genetischem Hintergrund exprimiert, treten nur geringgradige Nierenalterationen auf. (Alpers und Hudkins 2011, Kong et al. 2013, Betz und Conway 2016). *Db/db* Mäuse mit C57BL/6 genetischem Hintergrund entwickeln keine Dm-assozierten Nierenveränderungen, wohingegen *db/db* Mäuse mit C57BLKS/J genetischem Hintergrund frühstadiale Dm-assozierte Nierenalterationen entwickeln (Alpers und Hudkins 2011, Kong et al. 2013). Auch eigene Studien über *GIPR<sup>dn</sup>* transgene Mäuse, die im Institut für Tierpathologie der LMU München durchgeführt wurden, zeigen, dass der genetische Hintergrund ausschlaggebend für die Entwicklung diabetischer Nierenalterationen ist. *GIPR<sup>dn</sup>*



transgene Mäuse exprimieren einen dominant-negativen, glukoseabhängigen insulinotropen Polypeptidrezeptor unter der Kontrolle des Ratten Proinsulin 2-Gen Promotors. Mit CD1 bzw. FVB/N genetischem Hintergrund zeigen die Mäuse manifeste pathologische Dm-assozierte Nierenalterationen. Bei *GIPR<sup>dn</sup>* Mäusen mit C57BL/6 bzw. BALB/c genetischem Hintergrund hingegen treten keine vergleichbaren Nierenveränderungen auf (Popper 2013, Seibold 2015).

Auch beim Menschen ist bekannt, dass genetische Faktoren die Suszeptibilität der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie beeinflussen können (Rippin et al. 2001, Rüster und Wolf 2007, Wolf 2009, Rüster und Wolf 2011, Brennan et al. 2013, Florez 2016). Patienten, die auch nach 15 Jahren Diabetesdauer keine Nierenkomplikationen zeigen, die sog. Non-Progressors, gelten als genetisch geschützt vor einer diabetischen Nephropathie (Rüster und Wolf 2011).

In diesem Zusammenhang könnte u.U. auch eine während der Domestizierung durch Zucht hervorgerufene unbeabsichtigte „Resistenz“ gegenüber der diabetischen Stoffwechsellage beim domestizierten Hausschwein entstanden sein (Gerstein und Waltman 2006). Hausschweine wurden über viele Jahrhunderte auf einen hohen Körperfettanteil selektiert (Falkenberg und Hammer 2007). Dabei könnte es dazu gekommen sein, dass Schweine, die aufgrund der Adipositas einen Dm entwickelten und folglich krankheitsanfälliger und leichter als die gesunden Tiere waren, nicht für die weitere Zucht verwendet wurden. Resultiert hätte dann eine Zucht auf Dm-Resistenz und evtl. zusätzlich eine Zucht auf Resistenz gegenüber Dm-assozierten Läsionen.

Die Entwicklung eines beim Schwein „physiologischen organspezifischen Reaktionsmusters“ auf eine prolongierte Hyperglykämie könnte auch bei den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen eine Rolle spielen. Die Tiere zeigen bereits 24 Stunden nach Geburt erhöhte Blutglukosespiegel im Blut (Renner et al. 2013). Trotz der

diabetischen Stoffwechsellaage wurden in der vorliegenden Arbeit bei den transgenen Schweinen im Alter von 2 Jahren bzw. 3 Jahren (*INS*<sup>C94Y</sup> transgener Eber) keine pathologischen Dm-assozierten Nierenalterationen gefunden. Zutreffen könnte, dass eine „angezuchtete Resistenz“ gegenüber der Hyperglykämie, der Hypoinsulinämie, gegenüber Alterationen der zirkadianen Rhythmik des Plasmaglukosespiegels, der vermehrten Bildung von glykierten Endprodukten (AGEs) bzw. freien Sauerstoffradikalen (ROS), oder gegenüber der Einschleusung von Glukose in alternative Stoffwechselwege (Hexosaminstoffwechsel, Polyolstoffwechsel) ursächlich für das Fehlen Dm-assoziierter Veränderungen bei *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen ist. Schweine mit anderem genetischen Hintergrund wie beispielsweise Wildschweine könnten in künftigen Studien verwendet werden, um diese Theorie weiter zu untersuchen. Denn im Vergleich zu den domestizierten Tieren wurden Wildschweine nie auf einen hohen Körperfettanteil selektiert. Außerdem müssen diese Tiere in freier Wildbahn ihr Futter selbst suchen, was das Vorkommen von adipösen Tieren stark minimiert und eine evolutionäre Resistenzentwicklung gegen Dm relativ unwahrscheinlich macht. Im Umkehrschluss bestünde somit die Möglichkeit, dass zumindest ein Teil der Tiere bei kalorienreicher Diät einen Dm Typ 2 entwickeln könnte.

Hierfür spricht auch ein Beispiel beim Menschen: Pima Indianer aus Arizona stellen eine Population eines indigenen Volkstammes dar, die lange Zeit abgeschieden, ohne Zugang zu typisch westlicher kalorienreicher Ernährung, lebte und aufgrund der Abgeschiedenheit eine geringe genetische Variabilität aufweist. Heutzutage stellen Pima Indianer die Population mit der höchsten Prävalenz für Dm Typ 2 beim Menschen dar. Dies ist zu einem beträchtlichen Teil durch die Einflüsse der westlichen Zivilisation bedingt. Die veränderten Lebensumstände führen bei Pima Indianern vermehrt zu Entwicklung von Adipositas, metabolischem Syndrom und Dm

Typ 2, mit Entwicklung des gesamten Spektrums diabetischer Komplikationen (diabetische Makroangiopathie, diabetische Nephropathie, diabetische Neuropathie, diabetische Retinopathie) (Baier und Hanson 2004, Lemley 2008).

Die oben genannten Punkte verdeutlichen, dass weitere Studien an diabetischen Schweinen notwendig sind, um die Ausprägung einer diabetischen Nephropathie beim Schwein zu untersuchen, auch mit Rücksicht auf den genetischen Hintergrund der Tiere. Bislang befassen sich nur wenige Studien mit dem Auftreten diabetischer Nierenalterationen beim Schwein.

Maile et al. (2014) berichten von Nierenalterationen bei diabetischen männlichen Yorkshire Schweinen. Der Dm wurde bei diesen Tieren im Alter von 7-9 Wochen mit der Infusion von STZ über 3 Tage induziert. Im Anschluss erhielten die Tiere eine stark fetthaltige Diät und zeigten bei Versuchsende (nach 18 Wochen) Albuminurie, eine Verdickung der glomerulären Basalmembran, und die Verschmelzung podozytärer Fußfortsätze. Auch Merricks et al. (2009) haben in einer Studie über 18 adulte insulinresistente Schweine, die über ein Jahr eine stark fettreiche Diät erhielten, bei neun Tieren Nierenveränderungen (Glomerulosklerose, Zunahme der mesangialen Matrix, tubulointerstitielle Fibrose und arterioläre Hyalinose) festgestellt. Liu et. al. berichten von ähnlichen Ergebnissen bei vier Monate alten Chinese Bama Minischweinen, die über fünf Monate eine mit Fett angereicherte Diät erhielten (Liu et al. 2007, Liu et al. 2011).

All diesen Studien gemeinsam ist die Fütterung der Schweine mit einer Diät, die einen sehr hohen Fettanteil aufweist. Studien an Nagern belegen, dass fettreiche Ernährung zu Störungen im Lipidstoffwechsel und folglich zu einer Anreicherung von Lipiden in der Niere führt, was die Entstehung einer diabetischen Nephropathie begünstigt (Jiang et al. 2005, Wang et al. 2005, Amin et al. 2011, Liu et al. 2011).

*INS*<sup>C94Y</sup> transgene Schweine hingegen entwickeln einen permanenten neonatalen

Dm, unabhängig vom Futter. Eine fettreiche Diät wurde den Tieren zu keiner Zeit gefüttert. Somit muss künftig geklärt werden, ob die Nierenalterationen der Schweine in oben genannten Studien aufgrund der Störung im Lipidstoffwechsel oder aufgrund der diabetischen Stoffwechsellage entstanden sind.

Derzeit existiert nur ein diabetisches Schweinemodell, das unabhängig von der Fütterung diabetische Nierenalterationen zeigt. Diese genetisch modifizierten Schweine exprimieren eine Mutante des Hepatozyten Nuklearfaktors-1 $\alpha$  (HNF1A) und stellen somit ein Modell für den früher als MODY 3 bezeichneten Dm dar. Sie zeichnen sich durch erhöhte Blutglukosespiegel und die Entwicklung einer Proteinurie und einer progredienten Nephropathie aus (Hara et al. 2014, Wolf et al. 2014).

Unklar ist jedoch, ob die festgestellten Alterationen in den Nieren der Tiere aufgrund der diabetischen Stoffwechsellage entstanden sind, oder aufgrund der toxischen Effekte des Genprodukts, das die Tiere exprimieren. Denn die Expression ist hier nicht auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas beschränkt, sondern auch in zahlreichen anderen Organen nachzuweisen (Renner et al. 2013, Wolf et al. 2014).

## **5.4 Morphologische Untersuchung des Nervus fibularis communis**

### **zweijähriger *INS*<sup>C94Y</sup> transgener Schweine im Hinblick auf das Auftreten Dm-assoziierter Alterationen**

Die Untersuchung von Nerven der *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweine auf das Vorliegen Dm-assoziierter Nervenveränderungen erfolgte durch qualitativ-histologische und quantitativ-stereologische Untersuchungsmethoden.

Um der Frage nachzugehen, ob Anzeichen für eine periphere Neuropathie bei den diabetischen Tieren vorliegen, wurden Proben des Nervus fibularis untersucht. Dieser stellt einen sensomotorischen Zweig des Nervus ischiadicus dar und enthält

sowohl motorische als auch sensorische Fasern. Er reicht mit seinen Ästen bis zur Klaue des Schweins. Er innerviert die Beuger des Tarsalgelenks bzw. die Strecker der Zehengelenke sowie ein Hautareal dorsolateral am Unterschenkel. Bei diabetischen Nagetiermodellen wird meist der komplette Nervus ischiadicus untersucht (Wright und Nukada 1994, Artico et al. 2002, Freeman et al. 2016), da diese Tiere sehr viel kleiner sind und die Gewinnung von Nervenzweigen technisch anspruchsvoll ist. Beim Menschen werden Nervenbiopsien v.a. vom Nervus suralis, einem sensiblen Hautast des Nervus fibularis und des Nervus tibialis gewonnen, da er oberflächlich liegt, leicht zugänglich ist und der Sensitivitätsverlust nach der Biopsie auf einen kleinen Bereich am seitlichen Fußrücken beschränkt ist (Malik et al. 2001, Ginsberg et al. 2003, Malik et al. 2005).

Die qualitativ-histologische Auswertung der Nervenproben ergab keine Hinweise auf morphologische Unterschiede zwischen den zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen und den Wildtypkontrolltieren. Weder in den histologischen Schnittpräparaten noch bei den Nervenzupfpräparaten („Teasings“ (Drogemüller et al. 2010)) konnten Hinweise auf pathologische Alterationen gefunden werden. Auch die Ermittlung der sog. g-Ratio (das Verhältnis von Myelinscheide zu Axon), die einen etablierten Parameter bei der Untersuchung neuropathischer Erkrankungen darstellt (Rushton 1951, Chomiak und Hu 2009, Ugrenovic et al. 2016) und zur Identifizierung demyelinisierender Neuropathien herangezogen wird (Stikov et al. 2015, Duval et al. 2017), sowie die Ermittlung des entsprechenden quantitativ-stereologischen Parameters (Volumendichte der Myelinscheide in den Nervenfasern) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Tieren und den Kontrollschweinen. Somit wurden keine Hinweise auf das Vorliegen morphologischer Alterationen gefunden, die mit der diabetischen Neuropathie des Menschen vergleichbar wären.

Menschen, die an Dm erkrankt sind, entwickeln Dm-assozierte Alterationen an den Nerven meist erst nach langjähriger Diabetesdauer (Said 2007). Daher muss auch hier das relativ junge Alter der zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine in Betracht gezogen werden. Um das Auftreten pathologischer Nervenveränderungen bei älteren *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen zu untersuchen, sind künftige Studien notwendig.

Bislang liegen keine Publikationen aus Studien an diabetischen Schweinemodellen vor, die vom Auftreten Dm-assoziierter Neuropathien bei diesen Modellen berichten. Lediglich die verminderte Expression eines DAG-Rezeptors in den peripheren Nerven diabetischer Schweine wurde bisher mit der Entwicklung einer diabetischen peripheren Neuropathie in Verbindung gebracht (Juranek et al. 2014) bzw. das Auftreten autonomer neuropathischer Veränderungen im diabetischen Schweinemodell nachgewiesen (Mesangeau et al. 2000, Bulc et al. 2015). Somit muss auch im Hinblick auf die Entwicklung einer diabetischen Neuropathie beim Schwein die Möglichkeit einer durch selektive Zucht entstandenen Resistenz gegenüber Hyperglykämie-bedingter Folgeerkrankungen beim domestizierten Hausschwein in Erwägung gezogen werden.

Ein weiterer Aspekt, der auch bei der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie Beachtung findet, ist der genetische Hintergrund der Tiere. Das Beispiel der *db/db* Maus, die mit C57BLKS/J genetischem Hintergrund zuverlässig eine diabetische Neuropathie zeigt, nicht jedoch mit C57BL/6 genetischem Hintergrund, verdeutlicht, dass der genetische Hintergrund der Tiere entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung diabetischer Nervenalterationen hat. Beim Menschen werden derzeit ebenfalls genetische Risikofaktoren untersucht, die an der Entwicklung einer diabetischen Neuropathie beteiligt sind (Witzel et al. 2015). Somit sind weitere Studien an Schweinen mit anderem genetischen Hintergrund notwendig, um den

Einfluss des genetischen Hintergrunds auf das Auftreten Dm-assoziierter Nervenveränderungen zu untersuchen.

## **5.5 Morphologische Untersuchung von Blutgefäßen zweijähriger *INS<sup>C94Y</sup>* transgener Schweine im Hinblick auf das Auftreten Dm-assoziierter Alterationen**

Um das Auftreten Dm-assoziierter Gefäßalterationen bei den zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen zu untersuchen, wurden großlumige Gefäße analysiert, die bereits in vorangegangenen Studien zu diabetischer Atherosklerose bei experimentellen Schweinemodellen untersucht wurden (Gerrity et al. 2001, Van den Heuvel et al. 2012, Ludvigsen et al. 2015). Dazu zählten die Aorta, die Arteria carotis und die Herzkranzarterien.

Pathologische Befunde wurden bei der qualitativ-histologischen Untersuchung der Gefäßschnitte auch in Spezialfärbungen nicht erhoben. Die *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine zeigten ebenso wie die Kontrolltiere einen physiologischen Gefäßwandaufbau ohne atherosklerotische Auflagerungen.

Die Abwesenheit pathologisch-morphologischer Befunde im Hinblick auf das Auftreten einer diabetischen Makroangiopathie, die mit Dm-assozierten Gefäßalterationen beim Menschen vergleichbar wären, könnte wie bei den diabetischen mikroangiopathischen Komplikationen an der zu kurzen Dauer des Dm bei den zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen liegen.

Zusätzlich muss auch hier, wie bei der Niere und den Nerven, der genetische Hintergrund der Tiere als möglicher protektiver Umstand gegenüber der Entwicklung einer diabetischen Makroangiopathie in Betracht gezogen werden, bzw. das Vorliegen einer durch langjährige Zucht entstandenen Resistenz gegenüber diabetischen Folgeerkrankungen bei Hausschweinen berücksichtigt werden.

Zahlreiche Schweinemodelle finden in der Erforschung diabetischer atherosklerotischer Erkrankungen Verwendung (Gerrity et al. 2001, Dixon et al. 2002, Xi et al. 2004, Bellinger et al. 2006, Artinger et al. 2009, Van den Heuvel et al. 2012, Hamamdžić und Wilensky 2013, Ludvigsen et al. 2015). Allen gemeinsam ist die Fütterung einer „Western“ Diät, also die Verabreichung eines mit Fett, Cholesterin oder Saccharose angereicherten Futters und folglich die Induktion einer Dyslipidämie. Die *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweine erhielten im Gegensatz dazu keine atherogenen Diäten. Dies macht das Auftreten pathologischer Gefäßveränderungen aufgrund von Störungen im Lipidstoffwechsel eher wahrscheinlich als aufgrund der Hyperglykämie. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Al-Mashhadi et al. in einer Studie mit transgenen *D374Y-PCSK9<sup>+</sup>* Yucatan Minischweinen – ein Schweinmodell für Atherosklerose (Al-Mashhadi et al. 2015).

Bei den Schweinen wurde eine hyperglykämische Stoffwechsellaage durch die Applikation von STZ induziert. Alle Tiere, auch die Kontrolltiere, erhielten eine fettreiche Diät. Bei der Auswertung der Gefäßläsionen nach 42-51 Wochen unterschieden sich die atherosklerotischen Veränderungen bei den diabetischen Schweinen nicht von denen der Kontrolltiere. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Vorliegen einer Hyperglykämie wahrscheinlich nicht allein für die Entwicklung bzw. Progredienz atherosklerotischer Veränderungen verantwortlich ist (Al-Mashhadi et al. 2015).

## 5.6 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen das Vorhandensein von Pankreasalterationen bei zweijährigen *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen bzw. die Progredienz der Alterationen im Vergleich zu vormals von Renner et al. (2013) untersuchten jüngeren Tieren. Außerdem zeigen sie, dass zum untersuchten



Zeitpunkt, im Alter von zwei Jahren, keine Dm-assoziierten morphologischen Alterationen an den Nieren, den Nerven und den arteriellen Gefäßen der Schweine, die denen des Menschen entsprechen, vorlagen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse könnten weiterführende Studien über das mögliche Auftreten von diabetischen Folgeerkrankungen, entsprechend denen beim Menschen, bei diabetischen Tieren bzw. bei Schweinen mit alternativem genetischem Hintergrund erfolgen.

Derartige Untersuchungen befinden sich derzeit in Planung und werden zukünftige Einblicke in das Vorkommen und das Ausmaß Dm-assoziiierter Alterationen im porzinen Schweinmodell gewähren.

## 6. Zusammenfassung

Diabetes mellitus stellt weltweit eine der größten Gesundheitsgefährdungen des 21. Jahrhunderts dar. Nach einer Prognose der *International Diabetes Federation* wird die Zahl der Diabetiker von 415 Mio. Menschen im Jahr 2015 auf 616 Mio. im Jahr 2040 ansteigen. Oftmals ist die Erkrankung an Diabetes mellitus mit schweren Komplikationen und belastenden Folgeerkrankungen verbunden. Um die Lebensqualität der Patienten zu verbessern und der Ausprägung diabetischer Folgeerkrankungen vorzubeugen, ist die Entwicklung neuer Therapieansätze vonnöten. Hierfür ist die Verfügbarkeit geeigneter experimenteller diabetischer Tiermodelle in der Diabetesforschung von entscheidender Bedeutung.

Bisherige Studien verwendeten v.a. diabetische Nagetiermodelle, die jedoch zahlreiche Limitationen aufweisen. Aus diesem Grund wächst derzeit das Interesse an diabetischen Großtiermodellen, allen voran an Schweinmodellen, da Schweine in ihrer Physiologie dem Menschen relativ ähnlich sind.

Diabetische *INS<sup>C94Y</sup>* transgene Schweine, die aufgrund einer Mutation im Insulingen die Insulinmutante C94Y exprimieren und einen permanenten neonatalen Diabetes mellitus entwickeln (mutant insulin gene-induced diabetes of youth, MIDY), stellen solch ein porcines Großtiermodell dar. Um die Verfügbarkeit eines Kollektivs von zweijährigen weiblichen langzeitdiabetischen, suboptimal Insulin-therapierten *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen (n = 4) und entsprechenden nicht transgenen Kontrolltieren (n = 5) optimal zu nutzen und die Nachfrage nach einem für ein breites Analysespektrum geeigneten, qualitativ hochwertigen standardisierten Probenmaterials für Untersuchungen verschiedenster Disziplinen decken zu können, wurde 2014 eine bislang einzigartige Biobank (*Munich MIDY-Pig Biobank*) aus umfangreichen Gewebe- und Körperflüssigkeitenproben dieser Tiere angelegt. Zur eingehenden Charakterisierung von Diabetes mellitus-assoziierten Alterationen bei

zweijährigen diabetischen *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen wurde in der vorliegenden Arbeit umfangreiches Probenmaterial aus der *Munich MIDY-Pig Biobank* untersucht. Das Untersuchungsspektrum umfasste die Bestimmung von funktionell relevanten Parametern sowie qualitative und quantitativ-morphologische Analysen. Besonderes Augenmerk wurde auf Proben von Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten gelegt, in denen beim Menschen Diabetes mellitus-assoziierte Alterationen auftreten können (Pankreas, Niere, Nerven, Blutgefäße, Urin). Im Rahmen der Untersuchungen wurden Parameter analysiert, die etablierte Indikatoren für Diabetes mellitus-assoziierte Alterationen darstellen oder eine relevante Rolle in deren Pathogenese besitzen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen eine signifikante, progrediente Reduktion der Volumendichte und des Gesamtvolumens der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen im Pankreas der transgenen Tiere. Des Weiteren zeigen sie, dass bei den diabetischen Schweinen zum untersuchten Zeitpunkt keine, dem Menschen entsprechenden, Diabetes-assoziierten morphologischen Alterationen in Nieren, Nerven und Blutgefäßen vorliegen. Das Fehlen manifester Diabetes mellitus-assoziiierter Alterationen in den genannten Organen könnte in der vergleichbar kurzen Diabetesdauer von zwei Jahren bei *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen begründet liegen. Auch der genetische Hintergrund der Tiere könnte für die Anfälligkeit gegenüber der Entwicklung diabetischer Komplikationen eine Rolle spielen. Zudem könnte theoretisch auch eine durch Zucht unbeabsichtigt entstandene Resistenz gegenüber diabetischen Komplikationen beim domestizierten Schwein vorliegen.

Daher könnten zukünftige weiterführende Studien an älteren *INS*<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen bzw. an diabetischen Schweinen mit anderem genetischem Hintergrund erfolgen, um das Auftreten diabetischer Folgeerkrankungen weiter zu untersuchen.

## 7. Summary

Diabetes mellitus represents a major health issue of the 21<sup>st</sup> century. According to a prognosis of the *International Diabetes Federation*, the number of diabetic patients will increase from 415 million people in 2015 up to 616 million in the year 2040, worldwide. Diabetes mellitus is often associated with severe sequelae, impairing life-quality and life expectancy of affected patients. Amongst others, these include the so-called diabetic nephropathy, neuropathy and macro-angiopathy.

To improve the situation of patients suffering from diabetes mellitus associated complications, respectively prevent their development, new effective diagnostic and therapeutic strategies need to be developed. For this purpose, the availability of suitable experimental animal models of diabetes mellitus is urgently required. Commonly, rodent models have been used as models to study diabetes mellitus. However, these classical diabetic rodent models have several limitations, impairing their translational value. Therefore there is currently a steadily growing interest in large animal models, notably pig models, due to the similarity of porcine and human anatomy and physiology.

*INS*<sup>C94Y</sup> transgenic pigs expressing a mutant insulin protein represent a genetically modified large animal model for mutant insulin gene-induced diabetes of the youth (MIDY). To take advantage of the availability of a cohort (n =4) of female, long-term diabetic *INS*<sup>C94Y</sup> transgenic pigs with a sub-optimal insulin-treatment, and corresponding not genetically modified sex- and age-matched wild-type control animals, a comprehensive biobank collection of differentially processed, standardized samples of more than 40 different tissues and organs was established in 2014/15 (The *Munich MIDY-Pig Biobank*). The samples stored in the *Munich MIDY-Pig Biobank* are suitable for application of a broad range of different analytical procedures and provided freely to interested scientists, worldwide.

For a detailed further characterization of pig-organs, tissues and body liquids, whose human counterparts are commonly affected by diabetes mellitus-associated (morphological) alterations (pancreas, kidneys, blood vessels, nerves, urine), the present study used sample materials from the *Munich MIDY-Pig Biobank*. The spectrum of analyses included examinations of functionally relevant parameters, as well as comprehensive qualitative and quantitative morphological analyses of parameters representing established and pathogenetically relevant indicators of diabetes mellitus-associated alterations.

The results of the present and of previous studies verify a significant, progressive reduction of the volume density and the absolute volume of insulin-producing beta-cells in the pancreas of diabetic *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs, as compared to control animals. Furthermore, the analyses showed, that diabetic *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs of the examined age did not display diabetes mellitus related morphological alterations of the kidneys, blood vessels and nerves, comparable to those seen in human diabetic patients. On the one hand, the lack of manifest diabetes mellitus-associated lesions in these organs/tissues might be attributed to the relatively young age of the pigs, respectively to the comparably short duration of diabetes mellitus in two-year-old *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs. On the other hand, effects of the genetic background of the examined animals (Land-race hybrid pigs) might inhibit their susceptibility for development of manifest diabetic sequelae also. Over time, breeding-related side-effects could, for example, have coincidentally led to an (unintended), relative resistance to diabetic complications in the domesticated pig.

Therefore, further studies might use cohorts of elder *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs or examine diabetic pigs with different genetic backgrounds to analyze the occurrence of diabetes mellitus associated renal, neural, or vascular lesions in a pig model.

## 8. Literaturverzeichnis

Abbott, A. (2015). "Inside the first pig biobank." *Nature* **519**(7544): 397-398.

Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., Wunsch, A. und Wolf, E. (2010). "Transgenic pigs as models for translational biomedical research." *J Mol Med (Berl)* **88**(7): 653-664.

Al-Mashhadi, R. H., Bjorklund, M. M., Mortensen, M. B., Christoffersen, C., Larsen, T., Falk, E. und Bentzon, J. F. (2015). "Diabetes with poor glycaemic control does not promote atherosclerosis in genetically modified hypercholesterolaemic minipigs." *Diabetologia* **58**(8): 1926-1936.

Albl, B., Haesner, S., Braun-Reichhart, C., Streckel, E., Renner, S., Seeliger, F., Wolf, E., Wanke, R. und Blutke, A. (2016). "Tissue Sampling Guides for Porcine Biomedical Models." *Toxicol Pathol* **44**(3): 414-420.

Alpers, C. E. und Hudkins, K. L. (2011). "Mouse models of diabetic nephropathy." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **20**(3): 278-284.

Altunkaynak, B. Z., Önger, M. E., Altunkaynak, M. E., Ayranci, E. und Canan, S. (2012). "A Brief Introduction to Stereology and Sampling Strategies: Basic Concepts of Stereology." *Neuro Quantology* **10**(1): 31-43.

Amann, K. und Benz, K. (2007). "Diabetes mellitus." *Der Nephrologe* **2**(5): 319-324.

Amann, K., Velden, J. und Büttner, M. (2013). "Neue Klassifikation der diabetischen Nephropathie." *Der Nephrologe* **8**(6): 503-510.

American Diabetes Association, (2008). "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." *Diabetes Care* **31**(Supplement 1): 55-60.

Amin, K. A., Kamel, H. H. und Abd Eltawab, M. A. (2011). "Protective effect of Garcinia against renal oxidative stress and biomarkers induced by high fat and sucrose diet." *Lipids Health Dis* **10**: 6.

Anzil, A. P. (2012). Pathologie der Diabetesneuropathie In *Autonome Neuropathie bei Diabetes mellitus* (F. Strian and M. Halsbeck), SS. 42-54.

Artico, M., Massa, R., Cavallotti, D., Franchitto, S. und Cavallotti, C. (2002). "Morphological changes in the sciatic nerve of diabetic rats treated with low molecular weight heparin OP 2123/parnaparin." *Anat Histol Embryol* **31**(4): 193-197.

Artinger, S., Deiner, C., Loddenkemper, C., Schwimmbeck, P. L., Schultheiss, H. P. und Pels, K. (2009). "Complex porcine model of atherosclerosis: induction of early coronary lesions after long-term hyperlipidemia without sustained hyperglycemia." *Can J Cardiol* **25**(4): e109-114.

Baier, L. J. und Hanson, R. L. (2004). "Genetic studies of the etiology of type 2 diabetes in Pima Indians: hunting for pieces to a complicated puzzle." *Diabetes* **53**(5): 1181-1186.

Beckmann, J. P., Brem, G., Eigler, F. W., Günzburg, W., Hammer, C., Müller-Ruchholtz, W., Neumann-Held, E. M. und Schreiber, H. L. (2000). Tiere als Quelle für Xenotransplantate In *Xenotransplantation von Zellen, Geweben oder Organen: Wissenschaftliche Entwicklungen und ethisch-rechtliche Implikationen*, SS. 99-138. Springer Verlag.

Bellinger, D. A., Merricks, E. P. und Nichols, T. C. (2006). "Swine models of type 2 diabetes mellitus: insulin resistance, glucose tolerance, and cardiovascular complications." *Ilar j* **47**(3): 243-258.

Betz, B. und Conway, B. R. (2016). "An Update on the Use of Animal Models in Diabetic Nephropathy Research." *Curr Diab Rep* **16**(2): 18.

Blutke, A. (2007). Common patterns of glomerular gene expression profiles in different murine models of early nephropathy. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Blutke, A. (2016). Functionally Oriented Quantitative Morphological Analyses for Characterization of Organ Alterations in Different Animal Models in Biomedical Research. Habilitation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Blutke, A., Braun Reichhart, C., Albl, B., Streckel, E., Haesner, S., Renner, S., Wanke, R. und Wolf, E. (2014). The Munich MIDY-PIG Biobank: a unique resource for translational diabetes Research. Opening Conference COST Action BM1308. Sharing Advances on Large Animal Models (SALAAM). Munich, Gene Center, Ludwig-Maximilians-Universität. Abstract im Tagungsband S. 32.

Blutke, A., Renner, S., Flenkenthaler, F., Backman, M., Haesner, S., Kemter, E., Landstrom, E., Braun-Reichhart, C., Albl, B., Streckel, E., Rathkolb, B., Prehn, C., Palladini, A., Grzybek, M., Krebs, S., Bauersachs, S., Bahr, A., Bruhschwein, A., Deeg, C. A., De Monte, E., Dmochewitz, M., Eberle, C., Emrich, D., Fux, R., Groth, F., Gumbert, S., Heitmann, A., Hinrichs, A., Kessler, B., Kurome, M., Leipzig-Rudolph, M., Matiassek, K., Ozturk, H., Otzdorff, C., Reichenbach, M., Reichenbach, H. D., Rieger, A., Rieseberg, B., Rosati, M., Saucedo, M. N., Schleicher, A., Schneider, M. R., Simmet, K., Steinmetz, J., Ubel, N., Zehetmaier, P., Jung, A., Adamski, J., Coskun, U., Hrabe de Angelis, M., Simmet, C., Ritzmann, M., Meyer-Lindenberg, A., Blum, H., Arnold, G. J., Frohlich, T., Wanke, R. und Wolf, E. (2017). "The Munich MIDY Pig Biobank - A unique resource for studying organ crosstalk in diabetes." *Mol Metab* **6**(8): 931-940.

Bondy, C. A., Underwood, L. E., Clemmons, D. R., Guler, H. P., Bach, M. A. und Skarulis, M. (1994). "Clinical uses of insulin-like growth factor I." *Ann Intern Med* **120**(7): 593-601.

Brennan, E., McEvoy, C., Sadlier, D., Godson, C. und Martin, F. (2013). "The genetics of diabetic nephropathy." *Genes (Basel)* **4**(4): 596-619.

Brenner, B. M. (1983). "Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease." *Kidney Int* **23**(4): 647-655.

Breyer, M. D., Bottinger, E., Brosius, F. C., Coffman, T. M., Fogo, A., Harris, R. C., Heilig, C. W. und Sharma, K. (2005). "Diabetic nephropathy: of mice and men." *Adv Chronic Kidney Dis* **12**(2): 128-145.

Brosius, F. C., 3rd, Alpers, C. E., Bottinger, E. P., Breyer, M. D., Coffman, T. M., Gurley, S. B., Harris, R. C., Kakoki, M., Kretzler, M., Leiter, E. H., Levi, M., McIndoe, R. A., Sharma, K., Smithies, O., Susztak, K., Takahashi, N. und Takahashi, T. (2009). "Mouse models of diabetic nephropathy." *J Am Soc Nephrol* **20**(12): 2503-2512.

Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." *Nature* **414**(6865): 813-820.

Bulc, M., Gonkowski, S. und Calka, J. (2015). "Expression of Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (CART) in the Porcine Intramural Neurons of Stomach in the Course of Experimentally Induced Diabetes Mellitus." *J Mol Neurosci* **57**(3): 376-385.

Burute, N., Nisenbaum, R., Jenkins, D. J., Mirrahimi, A., Anthwal, S., Colak, E. und Kirpalani, A. (2014). "Pancreas volume measurement in patients with Type 2 diabetes using magnetic resonance imaging-based planimetry." *Pancreatology* **14**(4): 268-274.

Campbell-Thompson, M. L., Kaddis, J. S., Wasserfall, C., Haller, M. J., Pugliese, A., Schatz, D. A., Shuster, J. J. und Atkinson, M. A. (2016). "The influence of type 1 diabetes on pancreatic weight." *Diabetologia* **59**(1): 217-221.

Cefalu, W. T. (2006). "Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition." *Ilar j* **47**(3): 186-198.

Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K. und Kamper, E. (2009). "The use of animal models in the study of diabetes mellitus." *In Vivo* **23**(2): 245-258.

Chen, S. und Ziyadeh, F. N. (2008). "Vascular endothelial growth factor and diabetic nephropathy." *Current Diabetes Reports* **8**(6): 470-476.

Cho, N. H., Whiting, D., Forouhi, N., Guariguata, L., Hambleton, I., Li, R., Majeed, A., Mbanya, J. C., Aschner Montoya, P., Motala, A., Venkat Narayan, K. M., Ramachandran, A., Rathmann, W., Roglic, G., Shaw, J., Silink, M. und Zhang, P. (2015). *IDF DIABETES ATLAS 7th edition*, International Diabetes Federation.

Chomiak, T. und Hu, B. (2009). "What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach." *PLoS One* **4**(11): e7754.

Dische, F. E. (1992). "Measurement of glomerular basement membrane thickness and its application to the diagnosis of thin-membrane nephropathy." *Arch Pathol Lab Med* **116**(1): 43-49.



Dixon, J. L., Shen, S., Vuchetich, J. P., Wysocka, E., Sun, G. Y. und Sturek, M. (2002). "Increased atherosclerosis in diabetic dyslipidemic swine: protection by atorvastatin involves decreased VLDL triglycerides but minimal effects on the lipoprotein profile." *J Lipid Res* **43**(10): 1618-1629.

Dobretsov, M., Romanovsky, D. und Stimers, J. R. (2007). "Early diabetic neuropathy: triggers and mechanisms." *World J Gastroenterol* **13**(2): 175-191.

Drogemuller, C., Becker, D., Kessler, B., Kemter, E., Tetens, J., Jurina, K., Jaderlund, K. H., Flagstad, A., Perloski, M., Lindblad-Toh, K. und Matiassek, K. (2010). "A deletion in the N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) gene in Greyhounds with polyneuropathy." *PLoS One* **5**(6): e11258.

Drummond, K. und Mauer, M. (2002). "The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes." *Diabetes* **51**(5): 1580-1587.

Dudenredaktion (2014). *Duden - Die Deutsche Rechtschreibung*, Dudenverlag.

Duval, T., Le Vy, S., Stikov, N., Campbell, J., Mezer, A., Witzel, T., Keil, B., Smith, V., Wald, L. L., Klawiter, E. und Cohen-Adad, J. (2017). "g-Ratio weighted imaging of the human spinal cord in vivo." *Neuroimage* **145**(Pt A): 11-23.

Falkenberg, H. und Hammer, H. (2007). "Zur Geschichte und Kultur der Schweinezucht und -haltung. 3. Mitt.: Schweinezucht und -haltung in Deutschland von 1650 bis 1900." *Züchtungskunde* **2**: 92-110.

Florez, J. C. (2016). "Genetics of Diabetic Kidney Disease." *Semin Nephrol* **36**(6): 474-480.

Fogo, A. und Ichikawa, I. (1989). "Evidence for the central role of glomerular growth promoters in the development of sclerosis." *Semin Nephrol* **9**(4): 329-342.

Freeman, O. J., Unwin, R. D., Dowsey, A. W., Begley, P., Ali, S., Hollywood, K. A., Rustogi, N., Petersen, R. S., Dunn, W. B., Cooper, G. J. und Gardiner, N. J. (2016). "Metabolic Dysfunction Is Restricted to the Sciatic Nerve in Experimental Diabetic Neuropathy." *Diabetes* **65**(1): 228-238.

Gao, F. und Zheng, Z. M. (2014). "Animal models of diabetic neuropathic pain." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **122**(2): 100-106.

Gerrity, R. G., Natarajan, R., Nadler, J. L. und Kimsey, T. (2001). "Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine." *Diabetes* **50**(7): 1654-1665.

Gerstein, H. C. und Waltman, L. (2006). "Why don't pigs get diabetes? Explanations for variations in diabetes susceptibility in human populations living in a diabetogenic environment." *Cmaj* **174**(1): 25-26.

Ginsberg, L., King, R. und Orrell, R. (2003). "How to do it. Nerve biopsy." *Practical Neurology* **3**: 306-313.

Golias, C., Charalabopoulos, A., Stagikas, D., Charalabopoulos, K. und Batistatou, A. (2007). "The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system - bradykinin." *Hippokratia* **11**(3): 124-128.

Graham, M. L., Janecek, J. L., Kittredge, J. A., Hering, B. J. und Schuurman, H. J. (2011). "The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources." *Comp Med* **61**(4): 356-360.

Gurley, S. B., Mach, C. L., Stegbauer, J., Yang, J., Snow, K. P., Hu, A., Meyer, T. W. und Coffman, T. M. (2010). "Influence of genetic background on albuminuria and kidney injury in Ins2(+/-C96Y) (Akita) mice." *Am J Physiol Renal Physiol* **298**(3): F788-795.

Hamamdžić, D. und Wilensky, R. L. (2013). "Porcine models of accelerated coronary atherosclerosis: role of diabetes mellitus and hypercholesterolemia." *J Diabetes Res* **2013**: 761415.

Hara, S., Umeiyama, K., Yokoo, T., Nagashima, H. und Nagata, M. (2014). "Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans." *PLoS One* **9**(3): e92219.

Heinonen, S. E., Genove, G., Bengtsson, E., Hubschle, T., Akesson, L., Hiss, K., Benardeau, A., Yla-Herttuala, S., Jonsson-Rylander, A. C. und Gomez, M. F. (2015). "Animal models of diabetic macrovascular complications: key players in the development of new therapeutic approaches." *J Diabetes Res* **2015**: 404085.

Helmchen, U., Kneissler, U., Velden, J. und Stahl, R. A. K. (2006). "Nierenbiopsiebefunde bei Diabetes mellitus." *Der Diabetologe* **2**(5): 419-431.

Herbach, N., Schairer, I., Blutke, A., Kautz, S., Siebert, A., Goke, B., Wolf, E. und Wanke, R. (2009). "Diabetic kidney lesions of GIPRdn transgenic mice: podocyte hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and glomerulosclerosis." *Am J Physiol Renal Physiol* **296**(4): F819-829.

Hirose, K., Osterby, R., Nozawa, M. und Gundersen, H. J. (1982). "Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat." *Kidney Int* **21**(5): 689-695.

Howard, C. V. und Reed, M. G. (2005). *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurements in Microscopy*. Oxford, Garland Science/Bios Scientific Publishers.

Islam, M. S. (2013). "Animal models of diabetic neuropathy: progress since 1960s." *J Diabetes Res* **2013**: 149452.

Jani, A., Polhemus, C., Corrigan, G., Kwon, O., Myers, B. D. und Pavlakis, M. (2002). "Determinants of hypofiltration during acute renal allograft rejection." *J Am Soc Nephrol* **13**(3): 773-778.

Jensen, E. B., Gundersen, H. J. und Osterby, R. (1979). "Determination of membrane thickness distribution from orthogonal intercepts." *J Microsc* **115**(1): 19-33.

Jiang, T., Wang, Z., Proctor, G., Moskowitz, S., Liebman, S. E., Rogers, T., Lucia, M. S., Li, J. und Levi, M. (2005). "Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway." *J Biol Chem* **280**(37): 32317-32325.

Juranek, J. K., Geddis, M. S., Kothary, P., Hays, A., Schmidt, A. M. und Brannagan, T. H., 3rd (2014). "Reduced expression of Munc13-1 in human and porcine diabetic peripheral nerve." *Acta Histochem* **116**(1): 106-111.

Kemter, E. und Wolf, E. (2015). "Pigs pave a way to de novo formation of functional human kidneys." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(42): 12905-12906.

Kerner, W. und Brückel, J. (2015). "Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus." *Diabetologie und Stoffwechsel* **9**(S 02): 96-99.

Kerner, W., Fuchs, C., Redaelli, M., Böhm, B. O., Köbberling, J., Scherbaum, W. A. und Tillil, H. (2001). Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus, DDG Deutsche Diabetes-Gesellschaft e.V.

Kimmelstiel, P. und Wilson, C. (1936). "Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney." *Am J Pathol* **12**: 83-96.

King, A. J. (2012). "The use of animal models in diabetes research." *Br J Pharmacol* **166**(3): 877-894.

Kleinwort, K. J. H., Amann, B., Hauck, S. M., Hirmer, S., Blutke, A., Renner, S., Uhl, P. B., Lutterberg, K., Sekundo, W., Wolf, E. und Deeg, C. A. (2017). "Retinopathy with central oedema in an INS C94Y transgenic pig model of long-term diabetes." *Diabetologia* **60**(8): 1541-1549.

Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kemter, E., Nagashima, H., Schoser, B., Herbach, N., Blum, H., Wanke, R., Aartsma-Rus, A., Thirion, C., Lochmuller, H., Walter, M. C. und Wolf, E. (2013). "Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle." *Hum Mol Genet* **22**(21): 4368-4382.

Klymiuk, N., Bocker, W., Schonitzer, V., Bahr, A., Radic, T., Frohlich, T., Wunsch, A., Kessler, B., Kurome, M., Schilling, E., Herbach, N., Wanke, R., Nagashima, H., Mutschler, W., Arnold, G. J., Schwinzer, R., Schieker, M. und Wolf, E. (2012 a). "First inducible transgene expression in porcine large animal models." *Faseb j* **26**(3): 1086-1099.

Klymiuk, N., Mundhenk, L., Kraehe, K., Wuensch, A., Plog, S., Emrich, D., Langenmayer, M. C., Stehr, M., Holzinger, A., Kroner, C., Richter, A., Kessler, B., Kurome, M., Eddicks, M., Nagashima, H., Heinritzi, K., Gruber, A. D. und Wolf, E.

(2012 b). "Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis." *J Mol Med (Berl)* **90**(5): 597-608.

Klymiuk, N., Seeliger, F., Bohlooly, Y. M., Blutke, A., Rudmann, D. G. und Wolf, E. (2016). "Tailored Pig Models for Preclinical Efficacy and Safety Testing of Targeted Therapies." *Toxicol Pathol* **44**(3): 346-357.

Kong, L. L., Wu, H., Cui, W. P., Zhou, W. H., Luo, P., Sun, J., Yuan, H. und Miao, L. N. (2013). "Advances in murine models of diabetic nephropathy." *J Diabetes Res* **2013**: 797548.

Kriz, W. (2003). "Progression of chronic renal failure in focal segmental glomerulosclerosis: consequence of podocyte damage or of tubulointerstitial fibrosis?" *Pediatric Nephrology* **18**(12): 1317-1318.

Kundalic, B., Ugrenovic, S., Jovanovic, I., Stefanovic, N., Petrovic, V., Kundalic, J., Stojanovic, V., Zivkovic, V. und Antic, V. (2014). "Morphometric analysis of connective tissue sheaths of sural nerve in diabetic and nondiabetic patients." *Biomed Res Int* **2014**: 870930.

Lang, M. (2016). "Zufallsgenerator. net." from <http://www.zufallsgenerator.net/impressum.html>.

Larsen, M. O., Wilken, M., Gotfredsen, C. F., Carr, R. D., Svendsen, O. und Rolin, B. (2002). "Mild streptozotocin diabetes in the Gottingen minipig. A novel model of moderate insulin deficiency and diabetes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(6): E1342-1351.

Lechleitner, M., Abrahamian, H. und Francesconi, M. (2012). "[Diabetic neuropathy]." *Wien Klin Wochenschr* **124**(Supplement 2): 33-38.

Lemley, K. (2008). "Diabetes and chronic kidney disease: lessons from the Pima Indians." *Pediatric Nephrology* **23**(11): 1933-1940.

Lemmen, K. D. und Bornfeld, N. (2008). "Pathophysiologie und Stadieneinteilung der diabetischen Retinopathie und Makulopathie." *Der Diabetologe* **4**(2): 93-101.

Lichtenauer, U. D., Seissler, J. und Scherbaum, W. A. (2003). "Die diabetischen Folgeerkrankungen." *Der Internist* **44**(7): 840-852.

Liu, Y., Wang, Z., Yin, W., Li, Q., Cai, M., Zhang, C., Xiao, J., Hou, H., Li, H. und Zu, X. (2007). "Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat/ high-sucrose/ high-cholesterol diet." *Exp Anim* **56**(1): 11-20.

Liu, Y., Wang, Z. B., Yin, W. D., Li, Q. K., Cai, M. B., Yu, J., Li, H. G., Zhang, C. und Zu, X. H. (2011). "Preventive effect of Ibrolipim on suppressing lipid accumulation and increasing lipoprotein lipase in the kidneys of diet-induced diabetic minipigs." *Lipids Health Dis* **10**: 117.

Ludvigsen, T. P., Kirk, R. K., Christoffersen, B. O., Pedersen, H. D., Martinussen, T., Kildegaard, J., Heegaard, P. M., Lykkesfeldt, J. und Olsen, L. H. (2015). "Gottingen minipig model of diet-induced atherosclerosis: influence of mild streptozotocin-induced diabetes on lesion severity and markers of inflammation evaluated in obese, obese and diabetic, and lean control animals." *J Transl Med* **13**(1): 312.

Macauley, M., Percival, K., Thelwall, P. E., Hollingsworth, K. G. und Taylor, R. (2015). "Altered volume, morphology and composition of the pancreas in type 2 diabetes." *PLoS One* **10**(5): e0126825.

Mahimainathan, L., Das, F., Venkatesan, B. und Choudhury, G. G. (2006). "Mesangial cell hypertrophy by high glucose is mediated by downregulation of the tumor suppressor PTEN." *Diabetes* **55**(7): 2115-2125.

Maile, L. A., Busby, W. H., Gollahon, K. A., Flowers, W., Garbacik, N., Garbacik, S., Stewart, K., Nichols, T., Bellinger, D., Patel, A., Dunbar, P., Medlin, M. und Clemmons, D. (2014). "Blocking ligand occupancy of the  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin inhibits the development of nephropathy in diabetic pigs." *Endocrinology* **155**(12): 4665-4675.

Malik, R. A., Tesfaye, S., Newrick, P. G., Walker, D., Rajbhandari, S. M., Siddique, I., Sharma, A. K., Boulton, A. J., King, R. H., Thomas, P. K. und Ward, J. D. (2005). "Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy." *Diabetologia* **48**(3): 578-585.

Malik, R. A., Veves, A., Walker, D., Siddique, I., Lye, R. H., Schady, W. und Boulton, A. J. (2001). "Sural nerve fibre pathology in diabetic patients with mild neuropathy: relationship to pain, quantitative sensory testing and peripheral nerve electrophysiology." *Acta Neuropathol* **101**(4): 367-374.

Marco, E. D., Jha, J. C., Sharma, A., Wilkinson-Berka, J. L., Jandeleit-Dahm, K. A. und de Haan, J. B. (2015). "Are reactive oxygen species still the basis for diabetic complications?" *Clin Sci (Lond)* **129**(2): 199-216.

Marks, V., Cantor, T., Mesko, D., Pullmann, R. und Nosalova, G. (2002). *Differential Diagnosis by Laboratory Medicine. A Quick Reference for Physicians*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Marx, N. (2005). "Pathophysiologie der Atherosklerose bei Diabetes mellitus." *Der Diabetologe* **1**(2): 84-90.

Mattfeldt, T., Mall, G., Gharehbaghi, H. und Moller, P. (1990). "Estimation of surface area and length with the orientator." *J Microsc* **159**(Pt 3): 301-317.

Meier, M. und Haller, H. (2004). "[Diabetic nephropathy - current concepts in early diagnosis and treatment of diabetic microvascular complications]." *Herz* **29**(5): 496-503.

Merricks, E. P., Bellinger, D., Clemmons, D., Jennette, C., Raymer, R. und Nichols, T. (2009). "Albuminuria and Renal Histopathology in Hyperlipidemic, Insulin Resistant Swine." *The FASEB Journal* **23**(Supplement 1): 930.936.

Mesangeau, D., Laude, D. und Elghozi, J. L. (2000). "Early detection of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetic pigs using blood pressure and heart rate variability." *Cardiovasc Res* **45**(4): 889-899.

Mogensen, C. E. und Andersen, M. J. (1973). "Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes." *Diabetes* **22**(9): 706-712.

Neeb, Z. P., Edwards, J. M., Alloosh, M., Long, X., Mokelke, E. A. und Sturek, M. (2010). "Metabolic syndrome and coronary artery disease in Ossabaw compared with Yucatan swine." *Comp Med* **60**(4): 300-315.

Nentwich, M. M. und Ulbig, M. W. (2010). "Diabetische Retinopathie." *Der Diabetologe* **6**(6): 491-502.

Nyengaard, J. R. (1999). "Stereologic methods and their application in kidney research." *J Am Soc Nephrol* **10**(5): 1100-1123.

Nyengaard, J. R. und Gundersen, H. J. G. (2006). "Sampling for stereology in lungs." *European Respiratory Review* **15**(101): 107-114.

O'Brien, P. D., Sakowski, S. A. und Feldman, E. L. (2014). "Mouse models of diabetic neuropathy." *Ilar j* **54**(3): 259-272.

Oikonomou, D. und Rudofsky, G. (2012). "Diabetische Spätschäden. Besonders gefährdet: Nieren und Augen." *MMW-Fortschritte der Medizin* **13**: 71-75.

Omer, M. M. A., Eljack, A. H., Gar-alnabi, M. E. M., Mahmoud, M. Z., Elseid, M. und Edam, G. A. (2014). "Ultrasonographic Characteristics of Diabetes Impacts in Kidneys' Morphology." *Open Journal of Radiology* **4**(4): 7.

Osterby, R., Bangstad, H. J., Nyberg, G. und Rudberg, S. (2001). "On glomerular structural alterations in type-1 diabetes. Companions of early diabetic glomerulopathy." *Virchows Arch* **438**(2): 129-135.

Osterby, R. und Gundersen, H. J. (1975). "Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities." *Diabetologia* **11**(3): 225-229.

Pavenstadt, H., Kriz, W. und Kretzler, M. (2003). "Cell biology of the glomerular podocyte." *Physiol Rev* **83**(1): 253-307.

Peitz, B. und Peitz, L. (2000). *Schweine halten*, Eugen Ulmer GmbH & Co.

Perrotta, I. (2013). "Ultrastructural features of human atherosclerosis." *Ultrastruct Pathol* **37**(1): 43-51.

Popper, B. A. (2013). Impact of the genetic background on the development of diabetes-associated renal lesions in GIPRdn transgenic diabetic mice. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ramage, I. J., Howatson, A. G., McColl, J. H., Maxwell, H., Murphy, A. V. und Beattie, T. J. (2002). "Glomerular basement membrane thickness in children: a stereologic assessment." *Kidney Int* **62**(3): 895-900.

Rathmann, W., Tamayo, T., Landgraf, R., Schwarz, P. E. H., Siegel, E. G., Schnellbacher, E., Risch, E., Maier, B., Tschöpe, D., Diehm, C., Lawall, H., Wolf, G., Hammes, H. P., Ziegler, D., Danne, T., Ziegler, R., Holl, R. W., Grabert, M., Finck, H., Ebert, O., Zeyfang, A., Kleinwechter, H., Schäfer-Graf, U., Gallwitz, B., Kellerer, M., Matthaei, S., Müller-Wieland, D., Müller, U., Risse, A., Krüger, M., Icks, A., Ziegler, A., Häring, H., Hrabé de Angelis, M., Roden, M., Kulzer, B. und Twachtmann, J. (2015). *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2015*. G. Nuber, diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe.

Reidy, K. und Susztak, K. (2009). "Epithelial-mesenchymal transition and podocyte loss in diabetic kidney disease." *Am J Kidney Dis* **54**(4): 590-593.

Reinehr, T. (2005). "Pathophysiologie und Spätfolgen des Diabetes mellitus Typ 2." *Monatsschrift Kinderheilkunde* **153**(10): 927-935.

Reiners, K. und Haslbeck, M. (2006). "Sensomotorische diabetische Neuropathien." *Der Diabetologe* **2**(2): 92-103.

Remuzzi, A., Mazerska, M., Gephardt, G. N., Novick, A. C., Brenner, B. M. und Remuzzi, G. (1995). "Three-dimensional analysis of glomerular morphology in patients with subtotal nephrectomy." *Kidney Int* **48**(1): 155-162.

Remuzzi, G. und Bertani, T. (1990). "Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules?" *Kidney Int* **38**(3): 384-394.

Renner, S., Braun-Reichhart, C., Blutke, A., Herbach, N., Emrich, D., Streckel, E., Wunsch, A., Kessler, B., Kurome, M., Bahr, A., Klymiuk, N., Krebs, S., Puk, O., Nagashima, H., Graw, J., Blum, H., Wanke, R. und Wolf, E. (2013). "Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs." *Diabetes* **62**(5): 1505-1511.

Renner, S., Fehlings, C., Herbach, N., Hofmann, A., von Waldthausen, D. C., Kessler, B., Ulrichs, K., Chodnevskaia, I., Moskalenko, V., Amselgruber, W., Goke, B., Pfeifer, A., Wanke, R. und Wolf, E. (2010). "Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function." *Diabetes* **59**(5): 1228-1238.

Renner, S., Romisch-Margl, W., Prehn, C., Krebs, S., Adamski, J., Goke, B., Blum, H., Suhre, K., Roscher, A. A. und Wolf, E. (2012). "Changing metabolic signatures of amino acids and lipids during the prediabetic period in a pig model with impaired incretin function and reduced beta-cell mass." *Diabetes* **61**(8): 2166-2175.

Ripplin, J. D., Patel, A. und Bain, S. C. (2001). "Genetics of diabetic nephropathy." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **15**(3): 345-358.

Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Morawietz, G., Deslex, P., Keenan, C., Mahrt, C. R., Nolte, T., Robinson, M., Stuart, B. P. und Deschl, U. (2003). "Revised guides for

organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1." *Exp Toxicol Pathol* **55**(2-3): 91-106.

Rushton, W. A. (1951). "A theory of the effects of fibre size in medullated nerve." *J Physiol* **115**(1): 101-122.

Rüster, C. und Wolf, G. (2007). "Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie." *Der Nephrologe* **2**(5): 325-332.

Rüster, C. und Wolf, G. (2011). "Diabetische Nephropathie." *Der Nephrologe* **6**(5): 390-399.

Said, G. (2007). "Diabetic neuropathy - a review." *Nat Clin Pract Neurol* **3**(6): 331-340.

Saisho, Y., Butler, A. E., Meier, J. J., Monchamp, T., Allen-Auerbach, M., Rizza, R. A. und Butler, P. C. (2007). "Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes." *Clin Anat* **20**(8): 933-942.

Sanada, L. S., Tavares, M. R., Sato, K. L., Ferreira Rda, S., Neubern, M. C., Castania, J. A., Salgado, H. C. und Fazan, V. P. (2015). "Association of chronic diabetes and hypertension in sural nerve morphometry: an experimental study." *Diabetol Metab Syndr* **7**: 9.

Santos, V. P., Caffaro, R. A., Pozzan, G., Saieg, M. A. und Castelli Junior, V. (2008). "Comparative histological study of atherosclerotic lesions and microvascular changes in amputated lower limbs of diabetic and non-diabetic patients." *Arq Bras Endocrinol Metabol* **52**(7): 1115-1123.

Scherbaum, W. A. (2005). "Arteriosklerose und deren Komplikationen beim Diabetes mellitus." 2017, from <http://www.diabetes-heute.uni-duesseldorf.de/fachthemen/folgekrankheiten/herzkreislauf/index.html?TextID=1110>.

Scherle, W. (1970). "A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology." *Mikroskopie* **26**(1): 57-60.

Seibold, C. M. (2015). The influence of the genetic background on the development of diabetes mellitus and associated renal lesions in GIPRdn-transgenic mice. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Seyer-Hansen, K., Hansen, J. und Gundersen, H. J. (1980). "Renal hypertrophy in experimental diabetes. A morphometric study." *Diabetologia* **18**(6): 501-505.

Simm, A., Navarrete-Santos, A., Hofmann, B., Bushnaq, H. und Nass, N. (2012). "[Protein glycation as a pathological mechanism in diabetes]." *Z Gerontol Geriatr* **45**(2): 95-99.

Soma, P. und Pretorius, E. (2015). "Interplay between ultrastructural findings and atherothrombotic complications in type 2 diabetes mellitus." *Cardiovasc Diabetol* **14**: 96.



Sterio, D. C. (1984). "The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector." *J Microsc* **134**(Pt 2): 127-136.

Stikov, N., Campbell, J. S., Stroh, T., Lavelee, M., Frey, S., Novek, J., Nuara, S., Ho, M. K., Bedell, B. J., Dougherty, R. F., Leppert, I. R., Boudreau, M., Narayanan, S., Duval, T., Cohen-Adad, J., Picard, P. A., Gasecka, A., Cote, D. und Pike, G. B. (2015). "In vivo histology of the myelin g-ratio with magnetic resonance imaging." *Neuroimage* **118**: 397-405.

Stirban, A. O. (2011). "Pathogenetische Rolle der Advanced Glycation Endproducts (AGEs)." *Diabetes, Stoffwechsel und Herz* **30**(3): 191-193.

Stirban, A. O. und Tschoepe, D. (2008). "Cardiovascular Complications in Diabetes: Targets and interventions." *Diabetes Care* **31**(Supplement 2): 215-S221.

Streckel, E., Braun-Reichhart, C., Herbach, N., Dahlhoff, M., Kessler, B., Blutke, A., Bahr, A., Ubel, N., Eddicks, M., Ritzmann, M., Krebs, S., Goke, B., Blum, H., Wanke, R., Wolf, E. und Renner, S. (2015). "Effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in juvenile transgenic pigs modeling a pre-diabetic condition." *J Transl Med* **13**: 73.

Stumvoll, M. und Tönjes, A. (2011). "Typ-2-Diabetes." *Der Diabetologe* **7**(3): 179-193.

Sveen, K. A., Karime, B., Jorum, E., Mellgren, S. I., Fagerland, M. W., Monnier, V. M., Dahl-Jorgensen, K. und Hanssen, K. F. (2013). "Small- and large-fiber neuropathy after 40 years of type 1 diabetes: associations with glycemic control and advanced protein glycation: the Oslo Study." *Diabetes Care* **36**(11): 3712-3717.

Tervaert, T. W., Mooyaart, A. L., Amann, K., Cohen, A. H., Cook, H. T., Drachenberg, C. B., Ferrario, F., Fogo, A. B., Haas, M., de Heer, E., Joh, K., Noel, L. H., Radhakrishnan, J., Seshan, S. V., Bajema, I. M. und Bruijn, J. A. (2010). "Pathologic classification of diabetic nephropathy." *J Am Soc Nephrol* **21**(4): 556-563.

Thomas, P. K. (1999). "Diabetic neuropathy: mechanisms and future treatment options." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67**(3): 277-279.

Torres-Rovira, L., Astiz, S., Caro, A., Lopez-Bote, C., Ovilo, C., Pallares, P., Perez-Solana, M. L., Sanchez-Sanchez, R. und Gonzalez-Bulnes, A. (2012). "Diet-induced swine model with obesity/leptin resistance for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes." *ScientificWorldJournal* **2012**: 510149.

Ugrenovic, S., Jovanovic, I., Vasovic, L., Kundalic, B., Cukuranovic, R. und Stefanovic, V. (2016). "Morphometric analysis of the diameter and g-ratio of the myelinated nerve fibers of the human sciatic nerve during the aging process." *Anat Sci Int* **91**(3): 238-245.

Ulrichs, K., Bosse, M., Wacker, H. H., Heiser, A. und Muller-Ruchholtz, W. (1994). "Histologic analysis of the porcine pancreas to improve islet yield and integrity after collagenase digestion." *Transplant Proc* **26**(2): 610-612.

Van Belle, T. L., Taylor, P. und von Herrath, M. G. (2009). "Mouse Models for Type 1 Diabetes." *Drug Discov Today Dis Models* **6**(2): 41-45.

Van den Heuvel, M., Sorop, O., Koopmans, S. J., Dekker, R., de Vries, R., van Beusekom, H. M., Eringa, E. C., Duncker, D. J., Danser, A. H. und van der Giessen, W. J. (2012). "Coronary microvascular dysfunction in a porcine model of early atherosclerosis and diabetes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**(1): H85-94.

Vantyghem, M. C., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Gevaert, M. H., Hober, C., Defossez, A., Mazza, M. und Beauvillain, J. C. (1996). "Immunohistochemical and ultrastructural study of adult porcine endocrine pancreas during the different steps of islet isolation." *Histochem Cell Biol* **106**(5): 511-519.

Veron, D., Bertuccio, C. A., Marlier, A., Reidy, K., Garcia, A. M., Jimenez, J., Velazquez, H., Kashgarian, M., Moeckel, G. W. und Tufro, A. (2011). "Podocyte vascular endothelial growth factor (Vegf 164 ) overexpression causes severe nodular glomerulosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes." *Diabetologia* **54**(5): 1227-1241.

Voisey, J. und Van Daal, A. (2002). "Agouti: from mouse to man, from skin to fat." *Pigment Cell Res* **15**(1): 10-18.

Wang, Z., Jiang, T., Li, J., Proctor, G., McManaman, J. L., Lucia, S., Chua, S. und Levi, M. (2005). "Regulation of renal lipid metabolism, lipid accumulation, and glomerulosclerosis in FVBdb/db mice with type 2 diabetes." *Diabetes* **54**(8): 2328-2335.

Wanke, R. (2016). "Quantifizierung in der Morphologie – Wozu und wie?" *Nova Acta Leopoldina*. NF 121. Nr. 409: 59-81.

Wanke, R. (1996). Charakterisierung der renalen Alterationen Wachstumshormon-transgenerer Mäuse. Habilitation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wanke, R., Wolf, E., Brem, G. und Hermanns, W. (2001). "[Role of podocyte damage in the pathogenesis of glomerulosclerosis and tubulointerstitial lesions: findings in the growth hormone transgenic mouse model of progressive nephropathy]." *Verh Dtsch Ges Pathol* **85**: 250-256.

Weibel, E. R. (1979). "Stereological methods. I. Practical methods for biological morphometry." Academic Press, London.

Weibel, E. R. und Gomez, D. M. (1962). "A principle for counting tissue structures on random sections." *J Appl Physiol* **17**: 343-348.

Wiggins, R. C. (2007). "The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases." *Kidney Int* **71**(12): 1205-1214.

Witzel, I., Jelinek, H. F., Khalaf, K., Lee, S., Khandoker, A. H. und Alsafar, H. (2015). "Identifying Common Genetic Risk Factors of Diabetic Neuropathies." *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**: 88.

Wolf, E., Braun-Reichhart, C., Streckel, E. und Renner, S. (2014). "Genetically engineered pig models for diabetes research." *Transgenic Res* **23**(1): 27-38.

Wolf, G. (2005). "[The renin-angiotensin-aldosterone system - more complex as previously thought]." *Med Klin (Munich)* **100**(8): 471-477.

Wolf, G. (2009). "Diabetes und Niere – Update 2009." *Der Diabetologe* **5**(3): 190-199.

Wolf, G. und Zeier, M. (2007). "Diabetische Nephropathie." *Der Nephrologe* **2**(5): 311-312.

Wright, A. und Nukada, H. (1994). "Sciatic nerve morphology and morphometry in mature rats with streptozocin-induced diabetes." *Acta Neuropathol* **88**(6): 571-578.

Wuensch, A., Baehr, A., Bongoni, A. K., Kemter, E., Blutke, A., Baars, W., Haertle, S., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kessler, B., Faber, C., Abicht, J. M., Reichart, B., Wanke, R., Schwinzer, R., Nagashima, H., Rieben, R., Ayares, D., Wolf, E. und Klymiuk, N. (2014). "Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs." *Transplantation* **97**(2): 138-147.

Xi, S., Yin, W., Wang, Z., Kusunoki, M., Lian, X., Koike, T., Fan, J. und Zhang, Q. (2004). "A minipig model of high-fat/high-sucrose diet-induced diabetes and atherosclerosis." *Int J Exp Pathol* **85**(4): 223-231.

Yacoub, R. und Campbell, K. N. (2015). "Inhibition of RAS in diabetic nephropathy." *Int J Nephrol Renovasc Dis* **8**: 29-40.

Yeadon, J. (2015). "Choosing Among Typ II Diabetes Mouse Models." 2017, from <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2015/july/choosing-among-type-ii-diabetes-mouse-models>.

Zafar, M. und Naeem-UI-Hassan Naqui, S. (2010). "Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study." *International Journal of Morphology* **28**(1): 135-142.

Ziegler, D. (2008 a). "Autonome Neuropathie bei Diabetes." *Der Diabetologe* **4**(5): 379-389.

Ziegler, D. (2008 b). "Periphere Neuropathie bei Diabetes." *Der Diabetologe* **4**(4): 295-306.

Ziegler, D. (2012). "Neuropathie." *Der Diabetologe* **8**(5): 397-406.

Ziegler, D. (2014). "Update 2014 zur diabetischen Neuropathie." *Der Diabetologe* **10**(5): 376-383.

## 9. Anhang

### 9.1 Neuropathie-Symptom-Score (NSS)

<b>Symptomatik Fuß/Unterschenkel</b>	<b>Ja</b>	<b>Nein</b>
Brennen, Taubheitsgefühl, Parästhesien	2	0
Schwächegefühl (Ermüdung, Erschöpfung), Krämpfe, Schmerzen	1	0
<b>Lokalisation</b>		
Füße oder	2	
Unterschenkel oder	1	
Andere Lokalisation	0	
<b>Exazerbation</b>		
Nachts vorhanden oder	2	
Tagsüber und nachts vorhanden oder	1	
Nur tagsüber vorhanden	0	
Patient wird durch Symptome aus dem Schlaf geweckt	1	
<b>Besserung der Symptome beim</b>		
Gehen oder	2	
Stehen oder	1	
Sitzen oder Hinlegen	0	
<b>Gesamtscore:</b>		
NSS 3-4: leichte Symptome, 5-6 mäßige Symptome, 7-10 schwere neuropathische Symptome.		

Abbildung in Anlehnung an Ziegler (2008 b).

### 9.2 Neuropathie-Defizit-Score (NDS)

<b>Achillessehnenreflex</b>		
	Rechts	Links
Normal	0	0
Vermindert	1	1
Fehlend	2	2
<b>Vibrationsempfindung</b>		
Großzehengelenk oder medialer Malleolus	Rechts	Links
Normal	0	0
Vermindert/fehlend	1	1
<b>Schmerzempfindung</b>		
Fußrücken	Rechts	Links
Normal		
Vermindert/fehlend		

### Temperaturempfindung

	Rechts	Links
Fußrücken		
Normal	0	0
Vermindert/fehlend	1	1

### Gesamtscore:

NDS 3-5: leichte neuropathische Defizite, 6-8: mäßige neuropathische Defizite, 9-10: schwere neuropathische Defizite. Abbildung in Anlehnung an Ziegler (2008 b).

## 9.3 Dimensionen der logarithmischen Messskala für die Messung der GBM-Dicke ( $T_{h(\text{Glom})}$ )

Klasse	Untergrenze, mm	1 / Untergrenze, mm	Mittelpunkt, mm
Klasse A	2,0000	0,5000	0,4375
Klasse 1	2,6667	0,3750	0,3281
Klasse 2	3,5556	0,2813	0,2461
Klasse 3	4,7407	0,2109	0,1846
Klasse 4	6,3210	0,1582	0,1384
Klasse 5	8,4280	0,1187	0,1038
Klasse 6	11,2373	0,0890	0,0779
Klasse 7	14,9831	0,0667	0,0584
Klasse 8	19,9774	0,0501	0,0438
Klasse 9	26,6366	0,0375	0,0328
Klasse 10	35,5155	0,0282	0,0246
Klasse 11	47,3539	0,0211	0,0211

**Klasse A:** erste Skaleneinteilung, in der keine Messung der GBM erfasst werden kann.

**Klassen 1 – 11:** Skaleneinteilungen der Messskala, innerhalb denen die Messungen erfolgen.

**Untergrenze:** Beginn der nächsten Skaleneinteilung der Messskala, gemessen vom Ursprung der Messskala.

**Mittelpunkt der Klasse n:**  $((1/\text{Untergrenze der Klasse } n) + (1/\text{Untergrenze der Klasse } n+1))/2$

Schema mit freundlicher Genehmigung des Autors (PD Dr. Andreas Blutke, Institut für Tierpathologie, LMU München) übernommen aus Blutke (2007).

## 9.4 Rechenbeispiel für die Berechnung der Dicke ( $T_{h(\text{Glom})}$ ) der GBM

Für die Berechnung wurde Microsoft Excel verwendet.

Beispiel:

Glomerulum 1					Glomerulum 2			
Anzahl der Messungen	Mittel punkte	Mittelpunkte x Anzahl der Messungen			Anzahl der Messungen	Mittel punkte	Mittelpunkte x Anzahl der Messungen	
Klasse A	0	0,4375	0,4375 x 0	0	0	0,4375	0,4375 x 0	0
Klasse 1	13	0,3281	0,3281 x 13	4,2653	9	0,3281	0,3281 x 9	2,9529
Klasse 2	23	0,2461	0,2461 x 23	5,6603	24	0,2461	0,2461 x 24	5,9064
Klasse 3	17	0,1846	0,1846 x 17	3,1382	28	0,1846	0,1846 x 28	5,1688
Klasse 4	7	0,1384	0,1384 x 7	0,9688	11	0,1384	0,1384 x 11	1,5224
Klasse 5	4	0,1038	0,1038 x 4	0,4152	1	0,1038	0,1038 x 1	0,1038
Klasse 6	2	0,0779	0,0779 x 2	0,1558	0	0,0779	0,0779 x 0	0
Klasse 7	3	0,0584	0,0584 x 3	0,1752	0	0,0584	0,0584 x 0	0
Klasse 8	0	0,0438	0,0438 x 0	0	0	0,0438	0,0438 x 0	0
Klasse 9	0	0,0328	0,0328 x 0	0	0	0,0328	0,0328 x 0	0
Klasse 10	0	0,0246	0,0246 x 0	0	0	0,0246	0,0246 x 0	0
Klasse 11	0	0,0211	0,0211 x 0	0	0	0,0211	0,0211 x 0	0
<b>Summe der Spalte</b>	<b>69</b>			<b>14,7788</b>	<b>73</b>			<b>15,6543</b>

Glomerulum 1		Glomerulum 2	
$l_h$ mm	4,6688	$l_h$ mm	4,7271
M	26676	M	26676
$T_h$ 1 nm	148,56	$T_h$ 2 nm	148,38

$$\text{Mittlere } T_h = (T_h 1 + T_h 2) / 2 = (148,56 + 148,38) / 2 = 148,47 \text{ nm}$$

### Kalibrierung:

Kreuzgitter: 2160 Unterteilungen/mm

$$1 \text{ cm} = 10 \text{ mm} = 10000 \mu\text{m} = 10.000.000 \text{ nm}$$

$$1 \text{ Unterteilung des Kreuzgitters} = 4629,63 \text{ nm} = 0,000462963 \text{ cm}$$

Vergrößerungsfaktor = 10 gemessene Unterteilungen des Kreuzgitters auf dem Ausdruck in cm/0,000462963 cm

10 Unterteilungen des Kreuzgitters,

Gemessen auf dem Ausdruck in cm = 12,3 cm (1. Ebene), bzw. 12,4 cm (2. Ebene, 90° zur Ersten)

mittlere Länge von 10 Unterteilungen = (12,3 cm + 12,4 cm) / 2 = 12,35 cm

**Vergrößerungsfaktor M** = 12,35 cm / 0,000462963 cm = **26676**

Rechenbeispiel in Anlehnung an Blutke (2007).

## 9.5 Numerische Dichte der glomerulären Zellen im Glomerulum bei den Wildtypkontrolltieren und den *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen

Tiergruppe	Genotyp	N <sub>V(Y/Glom)</sub> [10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ]			SD			Signifikanz		
		Z	P	E+M	Z	P	E+M	Z	P	E+M
<b>Zweijährige weibliche Kontrolltiere (n = 5)</b>	<b>WT</b>	434	128	305	65	33	35	ns	ns	ns
<b>Zweijährige <i>INS<sup>C94Y</sup></i> transgene weibliche Schweine (n = 5)</b>	<b>TG</b>	435	137	298	83	39	47	ns	ns	ns
<b>Dreijähriger Kontrolleber</b>	<b>WT</b>	382	108	274						
<b>Dreijähriger <i>INS<sup>C94Y</sup></i> transgener Eber</b>	<b>TG</b>	435	134	301						

Y = Z: glomeruläre Zellen. Y = P: Podozyten. Y = E+M: Endothel- und Mesangiumzellen. WT: Wildtyp.

TG: transgenes Tier. SD: Standardabweichung; Vergleich WT vs. TG. Signifikanzniveau: ns = nicht signifikant.

## **10. Wissenschaftliche Publikationen in „Refereed Journals“ und Beiträge auf wissenschaftlichen Kongressen**

### **Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen (\*vortragende Person)**

Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S, Seeliger F, Wanke R, Wolf E, Blutke A\*. Standardized Tissue Sampling in Porcine Biomedical Models. Minipig Workshop. Freising, Deutschland, 23. und 24. September 2015.

### **Abstracts in Tagungsbänden**

Blutke A, Braun-Reichhart C, Albl B, Streckel E, Haesner S, Renner S, Wanke R, Wolf E. The Munich MIDY-PIG Biobank: a unique resource for translational diabetes research. Opening Conference of COST Action BM1308 “Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM”. München, Deutschland, 15. bis 17. Dezember 2014. Abstract im Tagungsband Seite 32.

Blutke A, Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Wolf E, Wanke R. Etablierung einer Gewebe-Biobank eines porcinen Diabetes mellitus Modelles. 58. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft. Fulda, Deutschland, 7. und 8. März 2015. Abstract im Tagungsband Seite 16.

### **Abstracts in „Refereed Journals“**

Blutke A, Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Wolf E, Wanke R. Etablierung einer Gewebe-Biobank eines porcinen Diabetes mellitus Modelles. Tierärztliche Praxis Kleintiere. Jahrgang 43. Heft 3. 2015. Seite 4.



Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S, Seeliger F, Wolf E, Wanke R, Blutke A. Tissue Sampling Guides for Porcine Biomedical Models. Toxicologic Pathology. Jahrgang 44. Heft 3. 2016. Seiten 414-420.

Wolf E, Blutke A, Wanke R, Renner S. Funktionelle Phänotypisierung von Schweinemodellen für die Diabetesforschung. Nova Acta Leopoldina. Band 121. Nummer 409. 2017. Seiten: 107-120.

Blutke A, Renner S, Flenkenthaler F, Backman M, Haesner S, Kempter E, Ländström E, Braun-Reichhart C, Albl B, Streckel E, Rathkolb B, Prehn C, Palladini A, Grzybek M, Krebs S, Bauersachs S, Bähr A, Brühshwein A, Deeg C, De Monte E, Dmochewitz M, Eberle C, Emrich D, Fux R, Groth F, Gumbert S, Heitmann A, Hinrichs A, Keßler B, Kurome M, Leipzig-Rudolph M, Matiasek K, Öztürk H, Otzdorff C, Reichenbach M, Reichenbach H D, Rieger A, Rieseberg B, Rosati M, Saucedo M N, Schleicher A, Schneider M R, Simmet K, Steinmetz J, Übel N, Zehetmaier P, Jung A, Adamski J, Coskun Ü, Hrabě de Angelis M, Simmet C, Ritzmann M, Meyer-Lindenberg A, Blum H, Arnold G J, Fröhlich T, Wanke R, Wolf E (2017). The Munich MIDY Pig Biobank - A unique resource for studying organ crosstalk in diabetes. Molecular Metabolism. Jahrgang 6. Heft 8. 2017. Seiten: 931-940.

## 11. Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rüdiger Wanke (Institut für Tierpathologie, LMU München) für die Ermöglichung dieser Dissertation und für die umfassende Betreuung bedanken. Das Dissertationsprojekt war eine große Herausforderung für mich, gleichzeitig jedoch auch eine Möglichkeit, viele neue Erfahrungen zu sammeln, die ich im Nachhinein nicht missen möchte.

Mein großer Dank gilt auch PD Dr. Andreas Blutke (Institut für Tierpathologie, LMU München), der mich in allen Belangen unterstützt hat und mich in die Methodik eingearbeitet hat. Vielen Dank für die viele Zeit, in der du all meine Fragen beantwortet hast und mir komplexe Themengebiete erklärt und näher gebracht hast.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kaspar Matiasek (Institut für Tierpathologie, Abteilung für klinische und vergleichende Neuropathologie, LMU München) und seinen Mitarbeitern, die mir bei allen neurologischen Fragen eine große Hilfe waren.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie der LMU München, allen voran Lisa Pichl, die mir bei der Vorbereitung und der praktischen Durchführung der Untersuchungen geholfen haben und mir das Arbeiten im Labor näher gebracht haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern des *Munich MIDY-Pig Biobank*-Teams und allen weiteren Unterstützern für die Ermöglichung des Projekts, die Durchführung der Sektionen und die umfangreiche Vor- und Nachbereitung (in alphabetischer Reihenfolge): Dr. Barbara Albl<sup>1</sup>, Sabine Arnold<sup>1</sup>, Dr. Stefan Bauersachs<sup>2</sup>, Dr. Andrea Bähr<sup>3</sup>, PD Dr. Andreas Blutke<sup>1</sup>, Dr. Christina Braun-Reichart<sup>3</sup>, Dr. Andreas Brükschwein<sup>4</sup>, Prof. Dr. Cornelia Deeg<sup>5</sup>, Erica De Monte<sup>3</sup>, Jessica Dietrich<sup>6</sup>, Michaela Dmochewitz<sup>3</sup>, Caroline Eberle<sup>1</sup>, Dr. Daniela Emrich<sup>1</sup>, Christian Erdle<sup>3</sup>, Josef Grieser<sup>1</sup>, Frauke Groth<sup>1</sup>, Sophie Gumbert<sup>1</sup>, Iris Hafner

Eichmann<sup>1</sup>, Marold Handl<sup>1</sup>, Antonia Heitmann<sup>1</sup>, Arne Hinrichs<sup>3</sup>, Eva-Maria Jemiller<sup>3</sup>, Prof. Dr. Andreas Jung<sup>6</sup>, Dr. Elisabeth Kemter<sup>3</sup>, Dr. Barbara Keßler<sup>3</sup>, Rita Koch<sup>6</sup>, Dr. Mayuko Kurome<sup>3</sup>, Dr. Miriam Leipzig<sup>1</sup>, Claudia Mair<sup>1</sup>, Prof. Dr. Kaspar Matiasek<sup>1</sup>, Doris Merl<sup>1</sup>, Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg<sup>4</sup>, Christina Nellen<sup>1</sup>, Michaela Nützel<sup>1</sup>, Hazal Öztürk<sup>1</sup>, Marjam O’Gorman<sup>1</sup>, Dr. Christiane Otzdorff<sup>4</sup>, Lisa Pichl<sup>1</sup>, Dr. Myriam Reichenbach<sup>3</sup>, Dr. Horst Reichenbach<sup>3</sup>, Dr. Simone Renner<sup>3</sup>, Alexandra Rieger<sup>1</sup>, Birte Rieseberg<sup>1</sup>, Judith Röder<sup>1</sup>, Dr. Marco Rosati<sup>1</sup>, Nicolas Saucedo<sup>3</sup>, Anna Schleicher<sup>3</sup>, Beate Schmidt<sup>1</sup>, PD Dr. Marlon Schneider<sup>3</sup>, Heidrun Schöl<sup>1</sup>, Tatjana Schröter<sup>3</sup>, Kilian Simmet<sup>3</sup>, Karin Stingl<sup>1</sup>, Dr. Elisabeth Streckel<sup>3</sup>, Dr. Patrizia Uhl<sup>5</sup>, Prof. Dr. Rüdiger Wanke<sup>1</sup>, Prof. Dr. Eckhard Wolf<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Institut für Tierpathologie, LMU München; <sup>2</sup>Institute of Agricultural Sciences, ETH Zürich; <sup>3</sup>Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, LMU München; <sup>4</sup>Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik, LMU München; <sup>5</sup>Lehrstuhl für Tierphysiologie, LMU München; <sup>6</sup>Pathologisches Institut, LMU München).

Danken möchte ich auch dem Institut für Begabtenförderung der Hanns-Seidel-Stiftung (unter der Leitung von Prof. Hans-Peter Niedermeier) für die ideelle und finanzielle Förderung die ich dank des Promotionsstipendiums erhalten habe.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, allen voran meinem Mann Dennis und meiner Tochter Alena, die mich über die gesamte Dauer des Dissertationsprojekts stets unterstützt haben.